



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2017

**Andreia Filipa
Rodrigues Silva**

**Efeito do processo de secagem nas propriedades
físico-químicas de macroalgas comestíveis**

**Effect of drying process on edible seaweed physical-
chemical properties**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2017

Andreia Filipa
Rodrigues Silva

**Efeito do processo de secagem nas propriedades
físico-químicas de macroalgas comestíveis**

**Effect of drying process on edible seaweed physical-
chemical properties**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Susana M. Cardoso, Equiparada a Investigadora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, do Doutor Artur M.S. Silva, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Helena Abreu, Co-fundadora da empresa Algaplus Lda.

Apoio financeiro à unidade de investigação QOPNA e ao grupo ReSyNa pela FCT, União Europeia, no âmbito do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE)

Projeto de investigação e desenvolvimento tecnológico Empresas em copromoção N° 3419, SHARP - *Seaweed for Healthier Traditional Products*, integrado no Programa Operacional Temático Competitividade e Internacionalização, apoiado pelos FEEI no âmbito do Programa "Portugal 2020"



o júri

presidente

Doutora Sónia Patrícia Marques Ventura

Equiparada a Investigadora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria do Rosário Gonçalves Dos Reis Marques Domingues

Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso

Equiparada a Investigadora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que de uma maneira ou de outra, perto ou longe, me acompanharam e apoiaram. Um especial agradecimento a todos aos colegas e amigos que o laboratório me proporcionou, pelo acolhimento, integração, disponibilidade fora de horas e companheirismo no dia-a-dia de trabalho. Aos orientadores que disponibilizaram todos os recursos para a execução deste trabalho e aos mais próximos e externos a todo o ambiente científico, família e amigos, pelo amparo.

palavras-chave

Macroalgas, processamento, lípidos, pigmentos, cor, secagem por ar quente, agar, ulvanas, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante

resumo

As macroalgas, ou “vegetais do mar”, são bons candidatos como alimento para a promoção de dietas saudáveis e equilibradas, por serem boa fonte de fibras dietéticas, aminoácidos essenciais, vitaminas e compostos fitoquímicos, sendo cada vez mais utilizadas como um ingrediente alimentar para enriquecer nutricionalmente outros alimentos ou hábitos alimentares. O elevado conteúdo em água faz das macroalgas um alimento perecível, sendo assim necessário proceder ao seu processamento para a sua conservação. A secagem é um dos métodos mais antigos e comuns de processamento de alimentos, sendo a secagem por ar quente (SAQ) muito usada ao nível empresarial. Neste trabalho pretendeu-se avaliar a velocidade de secagem das macroalgas *Ulva rigida*, *Gracilaria sp.*, *Fucus vesiculosus* e *Porphyra dioica* por SAQ a 25°C em ambiente empresarial, assim como o seu impacto na extração de lípidos totais e no seu respetivo perfil. Os lípidos totais foram extraídos com éter de petróleo por *soxhlet* seguido de derivatização e análise no GCMS para determinação do perfil lipídico. Adicionalmente foi também avaliado o efeito de diferentes temperaturas de secagem (25, 40 e 60°C), em condições laboratoriais, na cor e extração de compostos de interesse. A cor foi determinada pela leitura de coordenadas CIElab a^* , b^* e L^* , enquanto a extração de pigmentos, compostos fenólicos e análise da atividade antioxidante foi efetuada com acetona e metanol, respetivamente. Ainda, os polissacarídeos ulvanas e agar foram extraídos com soluções aquosas a partir das macroalgas *Ulva rigida* e *Gracilaria sp.*, respetivamente. O estudo do processo de SAQ a 25°C em secador industrial permitiu deduzir que a sequência de velocidade de secagem foi *Porphyra* > *Gracilaria* e *Fucus* > *Ulva*. Conclui-se ainda que a velocidade de secagem de todas as macroalgas foi afetada pela distribuição horizontal das torres dentro do secador. Além disso, as análises ao conteúdo em lípidos permitiram verificar que SAQ a 25°C promoveu uma maior extração de compostos lipídicos das macroalgas *Ulva* e *Fucus*, enquanto o comportamento oposto foi registado na macroalga *Gracilaria*. Adicionalmente os estudos de diferentes temperaturas de secagem (25, 40 e 60°C) permitiram concluir que SAQ a 40 e a 60°C provocaram mais alterações de cor, principalmente na *Gracilaria sp.* Ao nível dos pigmentos, os rendimentos de extração de clorofilas *a* e *b* e/ou seus derivados (*Cla* e *Clb*, respetivamente) na *Ulva* aumentaram após SAQ a 60°C ($2,74 \pm 0,20$ mg de *Cla* /g de macroalga), tendo também sido observado uma diminuição dos mesmos em *Fucus* e *Gracilaria* secas por SAQ a partir dos 40°C. Adicionalmente, as quantidades de ficobiliproteínas extraídas na *Gracilaria* aumentaram com SAQ a 25°C, mas diminuíram gradualmente com o aumento das temperaturas a partir dos 40°C. Por outro lado, a extração do agar e ulvanas não foi afetada por SAQ até aos 60°C nas macroalgas *Gracilaria* e *Ulva*, respetivamente. Já a recuperação de compostos fenólicos totais a partir das macroalgas *Gracilaria* e *Fucus* foram afetados pela SAQ, com particular ênfase nesta última macroalga à temperatura de 60°C. Nestas condições, o valor a recuperação de compostos fenólicos representou apenas 28% do obtido na condição controlo, tendo esta diminuição sido simultaneamente acompanhada pela menor atividade antioxidante dos respetivos extratos.

keywords

Macroalgae, Processing, lipids, pigments, color, hot air drying, agar, ulvans, total phenolic compounds, antioxidant activity

abstract

Macroalgae, or "sea vegetables", are good candidates as food to the promotion of healthy and balanced diets, once they are a good source of dietary fiber, essential amino acids, vitamins, and phytochemicals. Because of this, macroalgae are being increasingly used as a food ingredient in order to improve the nutritional value of foods and eating habits. The high water content of macroalgae turns them into a perishable food, which requires processing for long preservation. Drying is one of the oldest and most common methods of food processing, and in particular, hot air drying (SAQ) is extensively applied in macroalgae at the industry level. This work aimed to evaluate the dryind ratio of *Ulva rigida*, *Gracilaria sp*, *Fucus vesiculosus* and *Porphyra dioica* when using SAQ at 25°C at an industrial environmental, as well its impact on the recovered total fat extract and in its respective lipidic profile. Total fat was obtained with petroleum ether by soxhlet followed by derivatization and GCMS analysis to determine the lipid profile. In addition, this study also tested the effect of different drying temperatures (25, 40 e 60°C) at laboratory conditions, in the macroalgae's colour and on the yield of extraction of relevant macroalgae compounds. The color was determined through the reading of CIElab coordinates a^* , b^* and L^* , while the extraction of pigments, phenolic compounds and antioxidant activity analysis was performed with the use of acetone and methanol. In turn, the extraction of the polysaccharides ulvan and agar from *Ulva rigida* and *Gracilaria sp*, repectively, was obtained with water. In an industrial dryer at 25 °C, the drying rate was established as Porphyra> Gracilaria and Fucus> Ulva. It was also concluded that the drying speed of all macroalgae was affected by the horizontal distribution of the towers inside the dryer. Besides, fat and lipid analyses allowed to verify that SAQ at 25°C promoted a higher extraction of lipidic compounds from the Ulva and Fucus macroalgae, while the opposite behavior was registered for Gracilaria. In addition, this study aimed to evaluate the impact of different drying temperatures (25, 40 and 60°C) on color change and extraction of some compounds of interest. SAQ processing at 40 and 60°C caused the most color changes, especially in Gracilaria sp. At the pigment level, the extractive yields of *a* and *b* chlorophylls or their derivatives (C1a and C1b, respectively) in Ulva increased after SAQ at 60°C (2.74 ± 0.20 mg of C1a / g macroalga), while a decrement of C1a was observed for Fucus and Gracilaria treated dried by SAQ for 40° and 60°C. Additionally, the amounts of phycobiliproteins extracted in Gracilaria increased with SAQ at 25 °C, but gradually decreased with increasing temperatures from 40 °C. On the other hand, the extraction of agar and ulvans was not affected by SAQ up to 60°C for Gracilaria and Ulva, respectively. Still, the recovery of total phenolic compounds from the Gracilaria and Fucus was affected by SAQ, in particularly in this last macroalga at 60°C. Under these conditions, the recovery of phenolic compounds was only 28% in comparison to the control, and this decrement was accompanied by the lower antioxidant activity of the respective extracts

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Macroalgas marinhas	2
1.2. Produção de macroalgas marinhas.....	2
1.2.1. Sistemas de aquacultura multi-trófica integrada (IMTA).....	3
1.2.2. Algaplus-empresa de estágio	3
1.2.3. Influência dos fatores abióticos	5
1.3. Macroalgas na alimentação humana	7
1.3.1. Macroalgas na alimentação	7
1.3.2. Composição nutricional e compostos fitoquímicos.....	9
1.3.3. <i>Ulva rigida</i>	15
1.3.4. <i>Fucus vesiculosus</i>	17
1.3.5. <i>Gracilaria sp</i>	18
1.3.6. <i>Porphyra dioica</i>	19
1.4. Processamento de macroalgas.....	19
1.5. Processo de secagem.....	20
1.5.1. Métodos de secagem.....	20
1.5.2. Influência da secagem	21
1.6. Objetivos	26
2. Materiais e métodos	27
2.1. Amostras de macroalgas	27
2.2. Secagem das macroalgas em secador industrial a 25°C.....	27
2.3. Secagem de macroalgas em secador laboratorial com diferentes temperaturas ...	29
2.4. Determinação da humidade relativa das macroalgas	30
2.5. Análises de lípidos totais e perfil de ácidos gordos (macroalgas processadas em secador industrial).....	30
2.6. Análises físico-químicas de macroalgas sujeitas a diferentes temperaturas de secagem.....	32
2.6.1. Cor superficial	32
2.6.2. Índice de acastanhamento	33
2.6.3. Extração de pigmentos.....	33
2.6.4. Extração de Ulvanas em <i>Ulva rigida</i>	35
2.6.5. Extração de Agar em <i>Gracilaria sp</i>	36

2.7.	Extração de compostos fenólicos e avaliação da respetiva atividade antioxidante em <i>Gracilaria sp</i> e <i>Fucus vesiculosus</i>	36
2.7.1.	Compostos fenólicos totais.....	37
2.8.	Tratamento estatístico	37
3.	Resultados e discussão	38
3.1.	Secagem de macroalgas em ambiente industrial	38
3.1.1.	Determinação da humidade relativa	38
3.1.2.	Variáveis da secagem industrial: distribuição horizontal no secador e nível de altura nas torres de secagem.....	39
3.2.	Impacto da secagem industrial na gordura extraível e no perfil lipídico das macroalgas	46
3.2.1.	Lípidos totais	46
3.2.2.	Perfil lipídico	47
3.3.	Secagem das macroalgas à escala laboratorial	51
3.4.	Influência da temperatura de secagem na cor superficial das macroalgas.....	52
3.4.1.	Cor superficial	52
3.5.	Influência da temperatura de secagem na extração de compostos de interesse....	56
3.5.1.	Pigmentos	56
3.5.2.	Extração de Agar	60
3.5.3.	Extração de Ulvanas	61
3.5.4.	Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.....	62
4.	Conclusão	67
5.	Bibliografia.....	i
6.	Anexos.....	i
6.1.	Anexo A- Espectro de absorvância dos extratos aquosos de ficobiliproteínas.....	i

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema ilustrativo do sistema de aquacultura multi-trófica integrada.	3
Figura 2. Localização da sede (A), coordenadas GPS N 40.60463°W 8.6667° e local de produção (B) da empresa Algaplus Lda.	4
Figura 3. Estrutura química de compostos fenólicos de macroalgas: floroglucinol e florotanino.	15
Figura 4. Macroalga verde <i>Ulva rigida</i> , conhecida por "alface-do-mar".	16
Figura 5. Macroalga castanha <i>Fucus vesiculosus</i>	17
Figura 6. Macroalga vermelha do género <i>Gracilaria</i>	18
Figura 7. Macroalga vermelha do género <i>Porphyra</i>	19
Figura 8. Torres de tabuleiros usadas para acondicionar as macroalgas (A) no secador; Porta de entrada do secador e quadro de monitorização (B).	27
Figura 9. Esquema representativo de: torre de secagem constituída por 20 tabuleiros (à esquerda).	28
Figura 10. Esquematisação do procedimento de extração das ulvanas na <i>Ulva rigida</i>	36
Figura 11. Humidade relativa de <i>Ulva rigida</i> ao longo do processo de secagem em diferentes locais do secador.	40
Figura 12. Curvas de secagem de <i>Ulva rigida</i> : ensaio U1 (287,7 Kg de macroalga total); U2 (214,9 Kg de macroalga total), U3 (218,4 Kg); <i>Gracilaria sp</i> G1(178,8 Kg de macroalga total); <i>Fucus vesiculosus</i> F1 (178,8 Kg de macroalga total) e <i>Porphyra dioica</i> P1 (214,9 Kg de macroalga total) de acordo com as posições horizontais do secador	43
Figura 13. Monitorização da humidade relativa das macroalgas de três ensaios de secagem de <i>Ulva rigida</i> (U1, U2 e U3), <i>Gracilaria sp</i> (G1), <i>Fucus vesiculosus</i> (F1) e <i>Porphyra dioica</i> (P1) na torre da PosSD (●) do secador;	45
Figura 14. Teor de lípidos totais extraídos nas macroalgas controlo (C) e secas a 25°C (SAQ) de <i>Ulva rigida</i> , <i>Gracilaria sp</i> e <i>Fucus vesiculosus</i>	47
Figura 15. Perfis de lípidos representativos das macroalgas <i>Ulva rigida</i> , <i>Gracilaria sp</i> e <i>Fucus vesiculosus</i>	47
Figura 16. Curvas de secagem de <i>Ulva rigida</i> , <i>Gracilaria sp</i> e <i>Fucus vesiculosus</i> , realizadas num secador laboratorial de pequena escala a 25, 40 e 60 °C.	51
Figura 17. Esquematisação gráfica dos parâmetros de cor a*, b* e L* da <i>Ulva rigida</i> , <i>Gracilaria sp</i> e <i>Fucus vesiculosus</i> na condição controlo (C) e de amostras sujeitas a SAQ a 25°C (25), 40°C (40) e 60°C (60).	53
Figura 18. Cromatogramas do extrato de acetona das macroalgas <i>Ulva rigida</i> , <i>Gracilaria sp</i> e <i>Fucus vesiculosus</i>	56
Figura 19. Pigmentos fotossintéticos extraídos nas macroalgas <i>Ulva rigida</i> , <i>Gracilaria sp</i> e <i>Fucus vesiculosus</i>	58
Figura 20. Rendimentos de extração de agar da <i>Gracilaria sp</i> sujeitas a diferentes temperaturas de secagem.	61
Figura 21. Rendimentos de extração de ulvanas da <i>Ulva rigida</i> sujeitas a diferentes temperaturas de secagem.	62
Figura 22. Perfil de absorvância dos extratos aquosos de ficolibiproteínas da <i>Gracilaria sp</i> fresca (GF), seca a 25°C (GS), seca a 40°C (GS40) e seca a 60°C (GS60).	i

Lista de tabelas

Tabela 1. Exemplos de macroalgas marinhas autorizadas para consumo alimentar na Europa (CEVA, 2014).....	7
Tabela 2. Composição em minerais (mg/100g de peso seco) de macroalgas comestíveis (Pereira, 2011).	12
Tabela 3. Pigmentos majoritários existentes nos diferentes filos de macroalgas.	14
Tabela 4. Efeito de diferentes métodos de secagem em alguns parâmetros nutricionais das macroalgas <i>Kappaphycus alvarezii</i> e <i>Sargassum hemiphyllum</i>	23
Tabela 5. Caracterização do secador nos estudos de secagem industrial.	29
Tabela 6. Efeito da temperatura de medição da balança térmica ML-50 no tempo de análise e no valor da humidade relativa de macroalgas.....	38
Tabela 7. Comparação da humidade relativa (%) de <i>Ulva rigida</i> determinada por medição na balança térmica e pelo método de estufa.	39
Tabela 8. Concentração de compostos extraídos das frações lipídicas das amostras controlo de e secas das espécies <i>Ulva rigida</i> , <i>Gracilaria sp</i> e <i>Fucus vesiculosus</i>	49
Tabela 9. Índice de acastanhamento (IA) e diferenças totais de cor (ΔE^*) das macroalgas <i>Ulva rigida</i> , <i>Gracilaria sp</i> , e <i>Fucus vesiculosus</i> nos diferentes estados de processamento.	55
Tabela 10. Concentração de pigmentos extraídos (em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de macroalga) de <i>Ulva rigida</i> , <i>Fucus vesiculosus</i> e <i>Gracilaria sp</i>	59
Tabela 11. Conteúdo em compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante dos extratos de metanol de <i>Gracilaria sp</i> e <i>Fucus vesiculosus</i> submetidas a diferentes temperaturas de secagem.	64

Abreviaturas

AFC-aloficocianina

AG-ácido gálico

AGP- ácidos gordos polinsaturados

ALA-ácido α -linolénico

BHT-hidroxitolueno butilado

Carot-carotenoides

CFT-compostos fenólicos totais

*Cl*a-clorofila a

*Cl*b-clorofila b

DHA-ácido docosahexanóico

DPPH-2,2,-difenil-1-picril-hidroziolo

EAG- equivalentes de ácido gálico

EPA-Ácido eicosapentaenóico

EPG- equivalentes de floriglucinol

FC-ficocianina

FE-ficoeritrina

IA-Índice de acastanhamento

IMTA-aquacultura multitrófica integrada

PosCTR-posição central

PosENT-posição de entrada

PosSD-posição de saída

SAA- *score* em aminoácidos

SAQ-secagem por ar quente

SLS-secagem por luz solar

TRA- taxa de renovação da água

1. Introdução

O aumento da população mundial e a noção dos impactos das alterações climáticas, da produção agrícola atual e dos padrões de consumo a nível global faz da sustentabilidade um dos principais focos de atenção da sociedade atual (Tiwari and Troy, 2015a). Segundo a FAO, entre 2009 e 2050 é expectável que a população mundial cresça cerca de um terço, atingindo 2,3 biliões de pessoas (FAO, 2009). Por outro lado, a mesma organização estima que entre 2014 e 2016, cerca de 795 milhões de pessoas se encontrem subnutridas (FAO et al., 2015). Ao mesmo tempo, ao longo dos anos verificou-se o acréscimo da obesidade na população (World Health Organization, 2016), reflexo de uma distribuição desequilibrada dos recursos alimentares. Consequentemente, as estimativas afirmam ser necessário mais de dois planetas equivalente à Terra para suportar as necessidades globais em 2050 (Tiwari and Troy, 2015a). Torna-se assim premente uma gestão inteligente dos recursos para garantir o abastecimento de alimento e ultrapassar problemas de má nutrição. A promoção de estratégias nutricionais equilibradas e mais sustentáveis, que valorizem a diversidade e os ecossistemas e contribuam para a redução dos impactos ecológicos devem ser implementadas. Além disso, as “dietas sustentáveis” devem ser seguras, promover uma vida saudável, acessíveis, economicamente justas e culturalmente aceites (Burlingame, 2013)

Um dos recursos abundantes e pouco explorados são os oceanos e mares. Estes representam cerca de 70% da superfície terrestre e contêm uma enorme diversidade em organismos (incluindo peixes e algas), sendo assim uma fonte promissora de alimento (Forster and Radulovich, 2015). Apesar da pesca e aquacultura de peixes, bivalves, entre outros, serem as principais atividades exploratórias dos oceanos para fins alimentares, a exploração de algas tem expandido 8% por ano na última década, mais que os 6,2% na década passada. Em 2014, cerca de 28,5 milhões de toneladas de algas marinhas e outras foram colhidas para consumo direto ou para processamento no Japão, China e Coreia, que representam os seus maiores consumidores (FAO, 2016). Nos países ocidentais, tais como Escócia, Islândia, França, Canadá e País de Gales, as macroalgas marinhas são consumidas maioritariamente como ingredientes alimentares (Mahadevan, 2015). Na Europa, França é um dos países que mais consome macroalgas marinhas, como “vegetais do mar”.

As macroalgas de origem marinha possuem um papel fundamental na manutenção da biodiversidade marinha (Baweja et al., 2016) e a sua produção é sustentável. Não competem com as plantas terrestres por solo, fertilizantes químicos e água fresca. Para além

das boas propriedades como alimento, as macroalgas podem ser excelentes matérias-primas para biomassa e produção de biocombustíveis (Tiwari and Troy, 2015a). Quando integradas com a aquacultura, as macroalgas têm capacidade de biorremediação, convertendo os nutrientes em biomassa (Chopin et al., 2001). Na perspectiva de biorremediação, podem mediar a extração de parte de dióxido de carbono dissolvido na atmosfera (Forster and Radulovich, 2015), apresentando benefícios ambientais.

1.1. Macroalgas marinhas

As macroalgas podem ser definidas como organismos eucarióticos fotossintéticos e multicelulares, que à semelhança das plantas terrestres, utilizam a luz solar para extrair os nutrientes inorgânicos dissolvidos na água e produzir biomassa (Pereira and Yarish, 2008). A sua distribuição em ambiente marinho depende tanto de fatores químicos (salinidade, pH, nutrientes, gases, níveis de poluição), como físicos (temperatura, luz, substrato) e biológicos (herbívoros, micróbios, epífitos, simbioses, parasitas, doenças, entre outros). Com base na composição em pigmentos, as macroalgas são classificadas em castanhas (Phaeophyta), vermelhas (Rhodophyta) e verdes (Chlorophyta) (Baweja et al., 2016).

No geral, as macroalgas possuem um vasto leque de aplicações, que incluem a sua utilização como biomassa na indústria de ficocolóides (Bixler and Porse, 2011), a sua utilização como alimento ou ingrediente alimentar para consumo humano ou animal (Delaney et al., 2016; Holdt and Kraan, 2011), a exploração de compostos bioativos na área alimentar, médica, farmacêutica e de cosmética (Ibañez and Cifuentes, 2013; Mohamed et al., 2012), entre outras.

1.2. Produção de macroalgas marinhas

As macroalgas podem ser produzidas naturalmente, colhidas do seu habitat natural, ou produzidas por aquacultura numa perspectiva de larga escala. Em 2012, cerca de 21 mil toneladas de macroalgas foram utilizadas a nível global, das quais 94% foram produzidas em regime de aquacultura (White and Wilson, 2015).

Em 2014, a China e a Indonésia foram os maiores produtores de plantas aquáticas (maioritariamente macroalgas), com 13 326,3 e 10 077,0 mil toneladas produzidas, respetivamente. Considerando os 25 principais países produtores, a produção mundial de plantas aquáticas foi de 27 307,0 mil toneladas (FAO, 2016).

1.2.1. Sistemas de aquacultura multi-trófica integrada (IMTA)

O sistema de aquacultura multi-trófica integrada (IMTA, do inglês “integrated multi-trophic aquaculture”) é uma forma sustentável de aquacultura. Consiste no reaproveitamento dos compostos orgânicos e inorgânicos dos efluentes da aquacultura como fonte de nutrientes para o desenvolvimento de macroalgas e moluscos (ou ainda outros organismos extrativos), como representado na Figura 1. Simultaneamente, a capacidade de biorremediação minimiza os impactos ambientais associados ao excesso de matéria orgânica e nutrientes e potencia a produção de produtos valorizados, como as macroalgas (Chopin et al., 2001; Pereira and Yarish, 2008). Várias espécies de *Porphyra*, *Laminaria*, *Undaria*, e *Gracilaria* já estão incluídas no sistema IMTA (Pereira and Yarish, 2008). Estudos de cultivo de *Gracilaria* em sistemas IMTA demonstraram resultados positivos quanto à eficiência de biorremediação e à produtividade (Abreu et al., 2011, 2009).

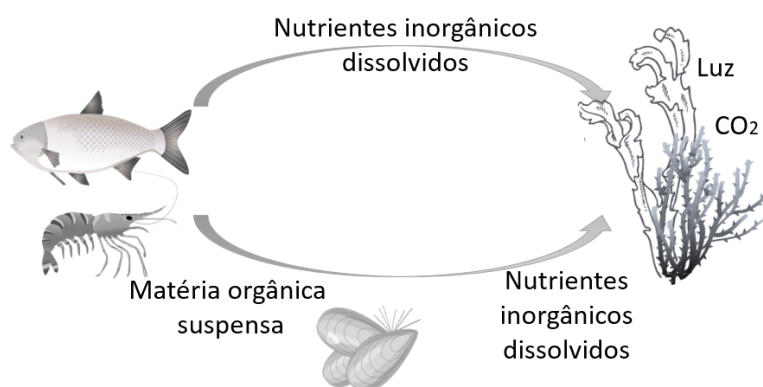


Figura 1. Esquema ilustrativo do sistema de aquacultura multi-trófica integrada.

1.2.2. Algapplus-empresa de estágio

A Algapplus Lda. é uma empresa de produção de macroalgas marinhas naturais e comestíveis e produtos derivados. Encontra-se sediada na incubadora de Empresas do Município de Ílhavo (A na Figura 2), subunidade do CIEMar. O local de produção e processamento localiza-se na zona da ria de Aveiro (B na Figura 2), associado a instalações de uma aquacultura de produção de peixe, a Materaqua.

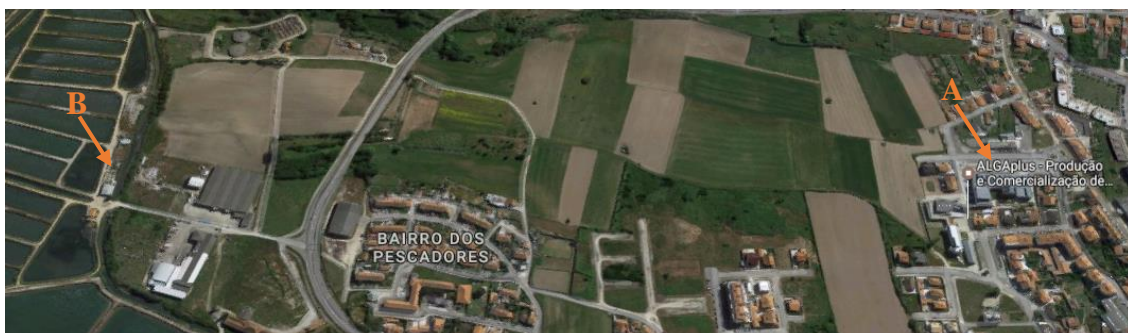


Figura 2. Localização da sede (A), coordenadas GPS N 40.60463°W 8.6667° e local de produção (B) da empresa Algaplus Lda.

A maioria das macroalgas na Algaplus (incluindo *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Porphyra dioica*) são produzidas de forma sustentável, por IMTA, onde o excesso de nutrientes libertados na aquacultura animal é aproveitado para o cultivo das mesmas. Uma das exceções é a espécie *Fucus vesiculosos*, que é normalmente colhida de populações que crescem naturalmente na aquacultura e colocada em tanques durante pelo menos uma semana para estabilização, antes de ser processada e comercializada. Todas as espécies cultivadas são nativas da costa portuguesa. Ao nível de processamento, a Algaplus executa por norma a lavagem com água salgada tratada, a secagem e/ou salga ou salmoura, a moagem e o empacotamento das macroalgas para a elaboração dos diversos produtos.

Na componente de investigação e desenvolvimento, a empresa trabalha continuamente na otimização dos processos de cultivo e processamento. Alguns dos objetivos da empresa passam por perceber que influência podem ter as manipulações das condições de cultivo, nomeadamente fatores abióticos, na produtividade e, assim como os métodos de processamento, nomeadamente a secagem, nas propriedades nutricionais e/ou bioativas das macroalgas produzidas.

Em Portugal, as informações sobre empresas que exploram comercialmente macroalgas, além da Algaplus, são muito limitadas. Apenas existem referências a algumas entidades que auxiliam esta atividade exploratória, designadamente a Companhia Portuguesa de Algas, unipessoal, Lda, que salga, seca e transforma produtos de pesca e aquicultura e a Associação de Pesca e Apanha de Algas de São Martinho do Porto.

Noutros países Europeus a exploração comercial de macroalgas por empresas é efetivamente maior. Alguns exemplos incluem a empresa Hortimare (Holanda), produtora de macroalgas pelo sistema IMTA, destinadas à alimentação humana, animal e para extração

de compostos valorizados, sendo também usadas para restaurar ecossistemas aquáticos (Hortim

are, n.d.). Macroalgas colhidas do mar também são exploradas para fins alimentares pela empresa espanhola Algamar (Algamar, 2016). As companhias Ocean Harvest (Irlanda) e C-Weed (França) usam macroalgas como matéria-prima para desenvolver formulações para rações animais (Ocean Harvest Technology, 2014). No caso de C-Weed, as macroalgas destinam-se principalmente à área da cosmética (C-weed, n.d.). Esta área é também explorada pela empresa Aleor (França), que desenvolveu técnicas e métodos de produção e processamento (secagem, moagem, extração) para otimização da sua exploração, apresentando no seu portfolio produtos como *SerumA - Eau végétale algalie* na área de cosmética, que é obtido pela recuperação do vapor da secagem, e outros na área alimentar (como plantas halófitas e macroalgas) (Aleur, 2014). Ainda, fora da Europa, as empresas Ocean Approved (Estados Unidos da América), Phycofood (Austrália), Seakura (Israel) desenvolvem produtos alimentares derivados de macroalgas para alimentação humana. Ao contrário da maior parte das empresas, a Ocean Approved utiliza a congelação das algas frescas como método de processamento (Ocean Approved, n.d.; Phyco Food, 2014; Seakura, n.d.) em vez da secagem, tradicionalmente usada.

1.2.3. Influência dos fatores abióticos

O *design* do tanque ou local de cultivo, a luz, temperatura, pH, concentrações de nutrientes no efluente de aquacultura, fluxo de água e densidade são alguns parâmetros físico-químicos que influenciam a composição química e as taxas de crescimento das macroalgas. Parâmetros biológicos, tais como a espécie, tipo de tecido em cultura, o ciclo de vida, controlo de estágios de reprodução, alterações morfológicas induzidas pelas técnicas de cultivo são igualmente essenciais para a otimização do sistema de cultivo (Chopin et al., 2001; Pereira and Yarish, 2008).

Os fatores abióticos são os parâmetros mais facilmente monitorizáveis, existindo vários trabalhos na literatura que avaliam o seu impacto, tais como os dos autores Abreu et al. (2011); Copertino et al. (2009); Marinho-Soriano et al. (2006) e Narayan et al. (2005). No estudo de Abreu et al. (2011), realizado numa empresa de exploração comercial de aquacultura, os autores evidenciaram a influência de vários fatores no cultivo de *Gracilaria vermiculophylla* em sistema IMTA. Baixos valores de temperaturas e baixos níveis de luz durante os meses de outono e inverno afetaram negativamente o crescimento e a capacidade

de remoção de nutrientes das águas pela macroalga. As taxas de renovação de água (TRA) mostraram ser fundamentais na manutenção do equilíbrio das condições abióticas, nomeadamente a temperatura, salinidade e pH, principalmente em períodos de chuvas intensas. TRA elevadas nos meses de outono e inverno equilibraram as condições adversas, promovendo um aumento ligeiro do crescimento da macroalga *Gracilaria*. A densidade de cultivo também influenciou o crescimento e a produtividade em biomassa, tendo-se verificado melhores resultados em tanques de baixa densidade de cultivo (3 kg/m²). Estes resultados devem-se ao facto de menores densidades de cultivo permitirem a incidência de luz na coluna de água a maiores profundidades, parâmetro essencial para a fotossíntese (Abreu et al., 2011). Por outro lado, o cultivo de *Ulva clathrata* em sistema de IMTA em pequena escala apresentou uma taxa específica média de crescimento maior no período de maior temperatura e salinidade (Copertino et al., 2009).

Marinho-Soriano et al. (2006) avaliaram a influência de vários fatores abióticos na composição química de *Gracilaria cervicornis* e *Sargassum vulgare*. Os autores verificaram que o aumento da temperatura, salinidade e intensidade solar afetavam o crescimento e a síntese de hidratos de carbono pelas duas espécies de algas. O conteúdo em azoto apresentou uma correlação positiva entre o conteúdo em proteínas, mas negativa relativamente ao conteúdo em hidratos de carbono, salinidade e temperatura da água (Marinho-Soriano et al., 2006). Por outro lado, Narayan et al. (2005) procuraram perceber qual a influência de fatores abióticos, como a localização geográfica, em nutrientes das macroalgas. No seu trabalho, os autores verificaram que espécies de *Sargassum* (*S. thunbergii* e *S. confusum*) proveniente de águas frias possuíam um maior conteúdo em ácidos gordos polinsaturados (AGP) do que a espécie *S. marginatum*, de águas temperadas. Concluíram ainda que, normalmente, os ácidos gordos são semelhante entre as espécies *Sargassum* provenientes de diferentes partes do globo mas a sua abundância foi variável, sendo o conteúdo em AGP influenciado pelo local de colheita (Narayan et al., 2005).

Adicionalmente, vários estudos indicam que a composição química das macroalgas é influenciada pela sazonalidade (Kumar et al., 2015; Nelson et al., 2002; Renaud and Luong-Van, 2006). Em particular, em relação ao perfil lipídico, Kim et al. (1996) registaram um maior conteúdo total em lípidos em *Fucus serratus* durante o verão, e paralelamente, o grau de insaturação de ácidos gordos era maior na época fria (primavera e inverno), como forma a equilibrar a fluidez da membrana. Por outro lado, em relação ao conteúdo em

antioxidantes (como os carotenoides), apesar de algumas controvérsias, é vulgarmente aceite que estes compostos exercem uma função foto-protetora nas algas, e que por essa razão, se acumulam em períodos de longa exposição solar. Exemplos que consolidam esta suposição são os descritos por Abdala-Díaz et al. (2006), Kumar et al. (2015) e Rönnberg and Ruokolahti. (1986) para diferentes espécies do género *Fucales*, entre as quais a *Fucus vesiculosus*.

1.3. Macroalgas na alimentação humana

1.3.1. Macroalgas na alimentação

Os maiores consumidores de macroalgas são os países asiáticos, em especial no Japão, em que a quantidade diária de algas consumidas como vegetais é cerca de 4 a 8 g *per capita*, em peso seco (Fleurence, 2016). O panorama é diferente nos países europeus, pois embora globalmente sejam conhecidas mais de 145 espécies edíveis, a sua utilização generalizada na alimentação é restringida pela legislação europeia (EC258/97). A nível europeu, a França implementou a primeira regulamentação aplicada ao uso de macroalgas para consumo humano. Na Tabela 1 estão descritas algumas das 21 macroalgas autorizadas para consumo como ingrediente ou “vegetais”. Apesar de na maior parte da Europa não serem considerados alimentos tradicionais, as algas são uma boa fonte de antioxidantes, fibras dietéticas, aminoácidos essenciais, vitaminas e compostos fitoquímicos, sendo usadas para enriquecer as propriedades nutricionais e de textura dos alimentos (Roohinejad et al., 2016). As algas kombu (género *Laminaria*), nori (género *Porphyra*) e wakame (*Undaria pinnatifida*) são as mais consumidas nos países asiáticos (Fujiwara-Arasaki et al., 1984; Murata and Nakazoe, 2001).

Tabela 1. Exemplos de macroalgas marinhas autorizadas para consumo alimentar na Europa (CEVA, 2014).

Filo	Nome científico	Nome comum
Chlorophyta (verdes)	<i>Ulva sp</i> *	Alface do mar
	<i>Enteromorpha sp</i> *	Aonori, Erva-patinha verde, Fitas-verdes
Phaeophyta (castanhas)	<i>Fucus vesiculosus</i>	Fava do mar
	<i>Ascophylum nodosum</i>	Rockweed, Egg wrack, Limo-de-nós
	<i>Himanthalia elongata</i>	Esparguete do mar

	<i>Undaria pinnatifida</i>	Wakame
	<i>Laminaria sp</i> *	Kombu, kelp
	<i>Saccharina latissima</i>	Sugar kelp, Royal kombu
	<i>Alaria esculenta</i>	Wakame atlântico,
	<i>Palmaria palmata</i>	Dulse, Botelho comprido
	<i>Porphyra sp</i> *	Nori, Erva Patinha
Rhodophyta (vermelhas)	<i>Chondrus crispus</i>	Musgo do mar, Musgo Irlandês
	<i>Gracilaria verrucosa</i>	“Cabelo de velha”
	<i>Mastocarpus stellatus</i>	Falso musgo Irlandês
	<i>Lithothamnium calcareum</i>	Maerl

*sp Refere-se a espécies de um género, não especificada

Também na Europa, as macroalgas vermelhas e castanhas são as mais utilizadas na alimentação (Dawczynski et al., 2007). Por exemplo, a incorporação de *Chondrus crispus* é utilizada em produtos láteos em França e na Irlanda, enquanto a *Palmaria palmata* é usada como ingrediente em pão, entre outros (Fleurence, 2016). A *Porphyra sp* (nori) é bastante aplicada em sushi e pelo seu sabor característico, quando torrada e cortada em pequenos pedaços pode ser adicionada a arroz, *noodles*, sopas, molho de soja, pão e saladas (Mahadevan, 2015). Em relação às macroalgas castanhas, a *Undaria pinnatifida*, pelo sabor ligeiramente doce, pode ser consumida torrada como *snack*, levemente cozinhada na sopa de miso ou reidratada em água e consumida em saladas (Mahadevan, 2015). Em produtos processados, esta macroalga perde a maioria das vitaminas, sendo mais nutritiva quando consumida crua. Por outro lado, as macroalgas do género *Laminaria* são aplicadas na cozedura de carnes, peixes, sopas, arroz e sopas. Podem ser usadas para elaboração de infusões, assim como as vesículas de *Fucus vesiculosus*. Em adição, macroalgas do género *Fucus sp*, pelo forte sabor a iodo e salgado, pode ser aplicada como ingrediente em pratos cozinhados (Mahadevan, 2015). Por exemplo, as cinzas alcalinas resultantes das macroalgas castanhas são usadas como agente alcalinizante em sopas (Stansbury et al., 2012). Apesar de menos utilizadas, as macroalgas verdes como *Ulva sp*, são empregues na confeição de saladas e processadas em folhas de algas para sushi, juntamente com algas do género *Enteromorpha* e *Monostroma* (Fleurence, 2016).

Embora o consumo de macroalgas seja ainda pouco comum na Europa, em relação aos países asiáticos, existe uma tendência para a introdução nos hábitos alimentares,

notando-se um aumento de novos produtos com macroalgas de elevada qualidade e marcas no mercado europeu. Em Portugal, além dos restaurantes de sushi, tem-se verificado cada vez mais a disponibilidade de produtos com macroalgas, de origem asiática e alguns europeus, em lojas de produtos naturais, *gourmet* e alguns supermercados.

1.3.2. Composição nutricional e compostos fitoquímicos

As macroalgas comestíveis vão ao encontro das tendências alimentares atuais, que cada vez mais valorizam a saúde e as dietas saudáveis. Note-se que cerca de 60 a 94% de massa das macroalgas é água (Abreu et al., 2014; Holdt and Kraan, 2011) e no geral estas são um alimento pouco calórico, pobre em lípidos, mas rico em fibras, proteínas, minerais, algumas vitaminas e vários compostos fitoquímicos. Em baixo descreve-se em maior detalhe alguns destes componentes.

a) Polissacarídeos

As paredes celulares das macroalgas são constituídas maioritariamente por celulosas, hemicelulosas e polissacarídeos neutros, da categoria das fibras insolúveis. A concentração de polissacarídeos totais pode variar entre 4 a 76% de peso seco (Holdt and Kraan, 2011).

Para além da celulose, outros polissacarídeos das paredes celulares, específicos em cada espécie, têm interesse comercial. Os alginatos, presentes na parede celular na forma de sais alcalinos de ácido algínico, e as fucoidanas, polissacarídeos sulfatados, são extraídos maioritariamente a partir de macroalgas castanhas do género *Laminaria* (nome sinónimo de *Saccharina*). Outros polissacarídeos sulfatados, como o agar, agente gelificante, é extraído maioritariamente das macroalgas vermelhas do género *Gracilaria* e *Gelidium*. O facto das macroalgas do género *Gracilaria* serem consideradas a maior fonte de agar e se encontrarem amplamente distribuídas em todo o mundo tem desencadeado estudos acerca da extração deste polímero (Kumar and Fotedar, 2009; Marinho-Soriano and Bourret, 2005; McHugh, 2003; Villanueva et al., 2010). Também as carragenanas, que se diferenciam em k-carragenanas (originam um gel frágil), iota-carragenanas (originam um gel elástico) e lambda (não gelificantes e comercialmente indisponíveis) são obtidas maioritariamente das macroalgas vermelhas do género *Kappaphycus* e *Eucheuma*. Os polissacarídeos sulfatados porfiranos estão descritos em algas vermelhas do género *Porphyra*. Por outro lado, as ulvanas, xilanas e outros polissacarídeos sulfatados são extraídos das macroalgas verdes (Bixler and Porse, 2011), em particular do género *Ulva* e *Caulerpa*, respetivamente. De entre

os polissacarídeos indicados, a celulose e as xilanas são fibras dietéticas insolúveis, enquanto o agar, o alginato, laminarina, porfirano e ulvanas pertencem ao grupo das fibras dietéticas solúveis (Murata and Nakazoe, 2001). Na indústria dos ficocolóides, os códigos europeus específicos são E407 para carragenanas, E406 para agar e E401 para o alginato de sódio (Food Standars Agency, 2016).

Quanto aos polissacarídeos de reserva específicos, os mais destacados são a laminarina (em macroalgas castanhas) e amido florídeo (em algumas macroalgas vermelhas) (Ibañez and Cifuentes, 2013; Murata and Nakazoe, 2001).

b) Proteínas

No geral, o conteúdo proteico das macroalgas é elevado nas verdes e vermelhas (10-47% por peso seco), enquanto o das macroalgas castanhas varia normalmente entre 5 a 15% do seu peso seco (Ibañez and Cifuentes, 2013). Para além disso, realça-se ainda o facto das proteínas de macroalgas possuírem grande parte dos aminoácidos essenciais, possuindo elevado valor nutricional. Note-se que o valor nutricional das proteínas dos alimentos é avaliado pelo seu *score* de aminoácidos (SAA), que tem em consideração a quantidade de aminoácidos essenciais de uma proteína, sendo o das macroalgas marinhas normalmente elevado e nutricionalmente superior ao das proteínas dos cereais e vegetais (embora inferior ao das proteínas de origem animal), fazendo das macroalgas uma boa fonte de aminoácidos essenciais (Murata and Nakazoe, 2001). Em espécies de macroalgas vermelhas o SAA, que varia entre 40 e 90% (Dawczynski et al., 2007; Parjikolaei et al., 2016) é significativamente superior ao SAA das espécies de macroalgas castanhas, que varia entre 20 a 70%, concluindo que as macroalgas vermelhas, em particular, representam uma importante fonte de proteína (Dawczynski et al., 2007). Deve-se, no entanto, realçar que os estudos de digestibilidade de macroalgas *in vivo* efetuados até ao momento são pouco conclusivos, sendo este um tópico que carece de bastante elucidação (Holdt and Kraan, 2011).

c) Lípidos

Apesar do baixo conteúdo em lípidos totais (cerca de 2% peso seco), as macroalgas são boa fonte de ácidos gordos polinsaturados (AGP), i.e., compostos essenciais somente obtidos pela alimentação. Os AGP podem dividir-se em séries de ómega 6 ($\omega 6$) e de ómega 3 ($\omega 3$). Os ácidos gordos $\omega 3$, como o eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), derivados do ácido α -linolénico (ALA), são importantes pelas alterações bioquímicas e

fisiológicas positivas que têm no organismo humano, entre as quais, promoção da diminuição da gordura do sangue, serem precursores de moléculas intervenientes em respostas bioquímicas e fisiológicas, entre outras. Além disso EPA e DHA existem em produtos marinhos, sendo as maiores fontes o fitoplâncton e as macroalgas (Narayan et al., 2006). É ainda importante realçar que as macroalgas apresentam uma baixa razão de ácidos gordos ómega 6: ómega 3 ($\omega 6/\omega 3$), inferior a 10, como recomendado pela Organização Mundial de Saúde (Ibañez and Cifuentes, 2013; Pereira et al., 2012; Sánchez-Machado et al., 2004).

Um estudo efetuado por Pereira et al. (2012), entre filós de macroalgas, concluiu que as macroalgas castanhas são a melhor fonte de AGP, variando entre 30 a 56% do seu conteúdo total de lípidos. Na maioria das espécies de Phaeophyta estudadas, EPA representava entre 6 a 14% do total dos lípidos. Outros ácidos gordos insaturados também se encontravam em quantidades consideráveis, como o ácido araquidónico que representava entre 11,5 e 18,6% do total dos lípidos e o ácido linoleico (6 a 23% dos lípidos totais). Por outro lado, os autores verificaram que no filo Chlorophyta, mais de 50% dos ácidos gordos totais eram ácidos gordos saturados, enquanto o total de AGP variava entre 17 a 35%, onde EPA representava apenas 1 e 4% da fração lipídica. Já no filo Rhodophyta, a variação em AGP foi maior (de 5 a 40%), tendo-se verificado elevados teores relativos em EPA, desde 15 a 27% do total de ácidos gordos. Os autores verificaram ainda que DHA existia em baixas concentrações em todos as espécies dos filós estudados (Pereira et al., 2012).

Para além dos ácidos gordos, existem esteróis, terpenóides, tocoferóis, carotenoides e outros pigmentos na fração lipídica insaponificável (Holdt and Kraan, 2011).

d) Minerais

Na generalidade as macroalgas possuem maior teor em ferro, sódio, magnésio, cálcio e potássio do que vegetais. Como exemplo, a Tabela 2 apresenta os valores médios de minerais de algumas macroalgas do filo Chlorophyta, Rhodophyta e Phaeophyta, onde se pode observar que em geral, os minerais sódio (Na) e potássio (K) são os mais abundantes, seguido do fósforo (P), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). As macroalgas verdes do género *Ulva* (*U. lactuca* e *U. rigida*) apresentam maior teor em ferro, relativamente às castanhas e vermelhas, enquanto as algas vermelhas normalmente são mais ricas em zinco. Realça-se o facto da maioria das macroalgas possuir uma razão de Na/K baixa, o que é benéfico em termos cardiovasculares (Pereira, 2011). Apesar de não representado na tabela, diversas

macroalgas são uma fonte de iodo. Nestas incluem-se as macroalgas *Enteromorpha sp* e a *Laminaria digitata*, com valores que podem atingir os 34 mg/8g e 60,3 mg/8g de macroalga seca, respetivamente (MacArtain et al., 2008).

Tabela 2. Composição em minerais (mg/100g de peso seco) de macroalgas comestíveis (Pereira, 2011).

Filo	Alga	Na	K	P	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu	Mn
Chlorophyta (Verdes)	<i>Ulva rigida</i>	1595	1561	210	524	2094	283	0,6	1,6	0,5
	<i>Caulerpa lentillifera</i>	8917	700 1142	103	780 1874	630 1650	4 9,3	2,6 3,5	7,9	0,1 2,2
	<i>Porphyra tenera</i>	3627	3500	-	390	565	10 11	2 3	3	0 63
Rhodophyta (Vermelhas)	<i>Gracilaria sp</i>	5465	3417	-	402	565	3,6 5	4,35	-	-
	<i>Palmaria palmata</i>	1600 2500	7000 9000	235	560 1200	170 610	50	2,86	1,14	0,3 76
	<i>Fucus vesiculosus</i>	2450 5469	2500 4322	315	725 938	670 994	4 11	3,71	5,50	<0 5
Phacophyta (Castanhas)	<i>Laminaria digitata</i>	3818	11,5 79	-	1005	659	3,2 9	1,77	<0,5	<0 5

e) Vitaminas

As macroalgas são consideradas uma fonte potencial de vitaminas apresentando, geralmente maior conteúdo em vitaminas A (β -caroteno), B₁, B₂, B₃, B₁₂, C do que os vegetais e frutas (Fujiwara-Arasaki et al., 1984; MacArtain et al., 2008). Num estudo efetuado por Murata e Nakazoe (2001), ao comparar o conteúdo em vitaminas de algumas macroalgas com tomate, espinafres, cenouras e laranjas, com base nas tabelas padrão da composição nutricional dos alimentos no Japão, os autores verificaram maior conteúdo em vitamina B₁ e B₂ nas macroalgas em geral, sendo as macroalgas *Enteromorpha compressa* e *Undaria pinnatifida* particularmente ricas em vitamina A, B e C (Murata and Nakazoe, 2001). Na comparação efetuada por MacArtain et al. (2008), *Undaria pinnatifida* e *Porphyra umbilicalis* foram as espécies com maiores conteúdos em vitaminas em geral, nomeadamente em vitamina C. Segundo MacArtain et al. (2008), algumas macroalgas, tais como a *Laminaria digitata* e a *Undaria pinnatifida*, chegam a exceder o conteúdo diário em

vitamina A recomendado, considerando porções de 8 g de peso seco. As vitaminas C e B₁₂ são igualmente abundantes em espécies do género *Ulva* (MacArtain et al., 2008).

f) Pigmentos

As macroalgas são também geralmente ricas em pigmentos, sendo os fotossintéticos os que mais contribuem para a sua coloração. De um modo geral, os pigmentos podem dividir-se em 3 classes: as clorofilas, os carotenoides e as ficobiliproteínas (Holdt and Kraan, 2011).

Tal como representado na Tabela 3, os diferentes filos das macroalgas são caracterizados por diferentes pigmentos. As macroalgas verdes são caracterizadas pela presença de clorofilas, principalmente *a* e *b*, sendo a última apenas exclusiva neste filo (Tiwari and Troy, 2015b). As clorofilas são pigmentos lipossolúveis verdes responsáveis pela fotossíntese. A clorofila *a* está envolvida na transdução da energia na membrana do cloroplasto e a clorofila *b* envolvida na receção da luz. Este filo de macroalgas contém também os carotenoides, nomeadamente o β -caroteno e várias xantofilas, como luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina (Holdt and Kraan, 2011; Lichtenthaler, 1987).

Os carotenoides são também um grupo diversificado de pigmentos que existem na maioria dos organismos fotossintéticos, como frutos, vegetais, plantas superiores e algas. São compostos terpénicos estruturalmente diversos, precursores do retinol (vitamina A), foto protetores, com potencial antioxidante de espécies reativas de oxigénio, intervenientes na síntese de hormonas, entre outras funções bioativas. Diferentes carotenoides, como α e β caroteno, luteína, zeaxantina, violaxantina e fucoxantina têm sido identificadas em macroalgas (Balboa et al., 2013; Fiedor and Burda, 2014). Os carotenoides α e β caroteno pertencem ao grupo dos carotenos e são precursores de outros, entre eles, luteína, zeaxantina e fucoxantina que pertencem ao grupo das xantofilas e absorvem radiação a comprimentos de onda típicos da cor vermelha, laranja ou amarela (Kraan, 2013). Por outro lado, a fucoxantina, pigmento dominante do grupo das xantofilas, é responsável pela coloração das macroalgas castanhas, por mascarar as clorofilas e outros pigmentos. A par desta, o β -caroteno e a violaxantina também estão normalmente presentes nas macroalgas castanhas. Por sua vez, nas macroalgas vermelhas, as clorofilas, os α e β -caroteno, a luteína e a zeaxantina são mascarados pelos pigmentos ficoeritrina e ficocianina (Haugan and Liaaen-Jensen, 1994; Saranya, 2013).

Por outro lado, as ficobiliproteínas são pigmentos de natureza proteica solúveis em água, maioritariamente presentes nas cianobactérias, macroalgas vermelhas e outras microalgas (Glazer, 1971). Dentro do grupo das ficobiliproteínas, as ficoeritrinas (cor vermelha) e ficocianinas (cor azul) são as mais relevantes. A ficoeritrina absorve radiação nos comprimentos de onda da luz verde, amarela e vermelha e a ficocianina absorve nos comprimentos de onda da luz azul, verde e amarela (radiações que penetram a água do mar em maior profundidade). Este facto permite a sobrevivência de organismos fotossintéticos em condições de baixa luminosidade (Tiwari and Troy, 2015b).

Tabela 3. Pigmentos maioritários existentes nos diferentes filos de macroalgas.

	Cor	Clorofilas	Ficobiliproteínas	Carotenoides
Chlorophyta	Verde	Clorofila <i>a</i> e <i>b</i>		β -caroteno Luteína Violaxantina Neoxantina Zeaxantina
Phaeophyta	Castanha	Clorofila <i>a</i>		Fucoxantina β -caroteno Violaxantina
Rhodophyta	Vermelha	Clorofila <i>a</i>	Ficoeritrina Ficocianina	α e β -caroteno Luteína Zeoxantina

g) Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos (ie uma classe de compostos caracterizados pela presença de vários grupos hidroxilo ligados aos seus anéis aromáticos) são aceites como compostos que exercem diversas atividades biológicas, desde a proteção contra radiação ultravioleta e agentes patogénicos, associada à sua capacidade antioxidante, como também pigmentação por contribuir para a cor, entre outras (Manach et al., 2004). Nas macroalgas, os compostos fenólicos mais relevantes derivam do floroglucinol e designam-se por florotaninos (Figura 3). Em maior detalhe, os florotaninos são oligómeros altamente hidrofílicos resultantes do acoplamento oxidativo de unidades monoméricas de floroglucinol através de ligações C-C e/ou C-O-C, podendo ser encontrados em vários tamanhos moleculares, desde 126 Da e 650 kDa (Catarino et al., 2017).

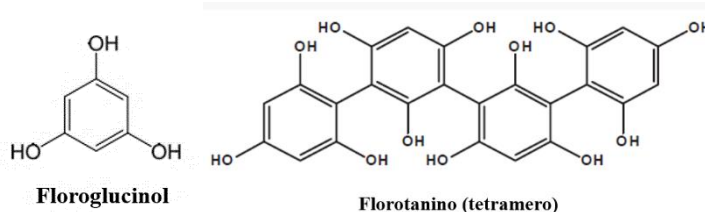


Figura 3. Estrutura química de compostos fenólicos de macroalgas: floroglucinol e florotanino.

Os florotaninos são compostos que se encontram exclusivamente em organismos marinhos, em particular nas macroalgas castanhas (Pal Singh and Bharate, 2006), existindo em baixas quantidades na maioria das macroalgas vermelhas e verdes (Mabeau and Fleurence, 1993). Nas macroalgas castanhas, estes compostos encontram-se armazenados em vesículas de secreção especializadas, que pode representar até 25% do peso seco da macroalga (Koivikko et al., 2005).

Durante os últimos anos, tem havido um interesse crescente pelos metabolitos das macroalgas devido às numerosas atividades biológicas que apresentam, demonstrando potencial em serem aplicados nas indústrias alimentares, farmacêuticas, cosméticas, entre outras. Pela abundância destes compostos em particular nas macroalgas da ordem Fucaceae, as macroalgas castanhas têm ganho interesse económico na utilização como ingredientes naturais em comidas ou até mesmo na área nutracêutica (Holdt and Kraan, 2011).

As macroalgas são conhecidas pelo seu potencial antioxidante, que no geral se encontra associado à presença de alguns compostos, entre os quais os carotenoides, α e β caroteno, luteína, zeaxantina, violaxantina e fucoxantina e compostos fenólicos, onde os últimos exibem especial relevância. Por esta razão e, na tentativa de valorizar as macroalgas produzidas pela Algaplus, as espécies a seguir referidas foram consideradas no estudo.

1.3.3. *Ulva rigida*

Ulva rigida é uma macroalga verde (Figura 4), pertencente ao filo Chlorophyta. Pela estrutura semelhante a uma alface, a *Ulva rigida*, é denominada “alface-do-mar”. É constituída por um talo de cor verde clara com duas membranas de células, achatado e membranoso, de forma e dimensão variável. Esta alga é vulgarmente utilizada para confeção de sopas e saladas (Neto et al., 2005).

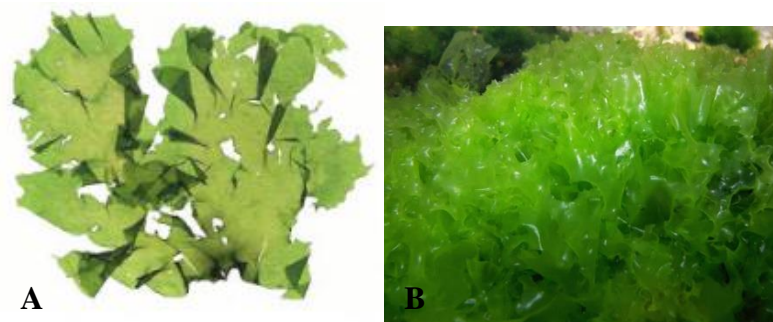


Figura 4. Macroalga verde *Ulva rigida*, conhecida por "alface-do-mar". (A) foto de Pereira (2009); (B) foto de Roberto Pillon licenciada por CC BY-NC-SA.

Note-se que as algas verdes normalmente habitam em zonas costeiras e a baixa profundidade e toleram concentrações elevada de nutrientes, sendo dominantes durante períodos de eutrofização. Quando em condições favoráveis, facilmente geram populações. A *Ulva rigida* enquadra-se neste contexto, que faz dela uma macroalga oportunista (Baweja et al., 2016) e com potencial económico.

Para além do interesse a nível alimentar, as algas verdes em geral são uma fonte natural de ingredientes ativos. Exemplo disso são as ulvanas, também conhecidos por polissacarídeos sulfatados, solúveis em água. Apesar de variável na sua composição, estes polissacarídeos são maioritariamente constituídos por ramnose, xiloses, ácidos idurónico e ácido glucurónico, sulfatados ou parcialmente sulfatados nos resíduos de ramnose e xilose (Lahaye and Ray, 1996). Juntamente com a celulose e, em menores frações, xiloglucanas e glucuranas, as ulvanas constituem grande parte das paredes celulares de algas verdes pertencentes à ordem Ulvales, nomeadamente do género *Ulva* e *Enteromorpha* (Lahaye and Robic, 2007a). O interesse no campo medicinal e farmacêutico das algas verdes (incluindo a *Ulva rigida*) deve-se essencialmente à atividade bioativa das ulvanas, uma vez que estes polissacarídeos são genericamente aceites como possuindo atividade anti-tumoral, imunomodelativa, anti-hiperlipidémica, anticoagulante, antioxidante, entre outras (Alves et al., 2013; Wang et al., 2014). Exemplos específicos da bioatividade de ulvanas foram demonstrados no polissacarídeo extraído de *Ulva lactuca*, que revelou atividade anti-tumoral em diferentes linhas de células cancerígenas humanas (Thanh et al., 2016). Já Mezghani et al. (2013) verificaram atividade antioxidante promissora de ulvana extraída de *Ulva rigida* num modelo celular de stress oxidativo (Mezghani et al., 2013).

1.3.4. *Fucus vesiculosus*

Fucus vesiculosus é uma espécie pertencente à ordem Fucales e ao filo Phaeophyta, comum no norte do oceano atlântico. Morfologicamente possui um talo achatado, ramificado e com extremidades finas, possuindo uma área engrossada na zona central do talo como uma nervura central, como é visível na Figura 5 A (Guiry, n.d.). Tal como as macroalgas do género *Fucus*, contem pequenas vesículas de ar na superfície do seu talo que lhe permite flutuar quando submersa e encontra-se normalmente em águas temperadas. A fucoxantina é o pigmento responsável pela sua coloração castanha (Baweja et al., 2016).



Figura 5. Macroalga castanha *Fucus vesiculosus*. (A) foto de Pereira (2009); (B) foto de Filip Nuytens licenciada por CC BY-NC-SA.

Na Europa, a maior parte dos suplementos derivados de macroalgas derivam de espécies do género *Fucus*, sendo estes associados ao combate da deficiência em iodo e à supressão do apetite devido ao elevado conteúdo em fibra destas macroalgas (Abreu et al., 2014). Em geral as macroalgas castanhas, incluindo *Fucus vesiculosus*, são conhecidas por serem particularmente abundantes em compostos fitoquímicos e de valor acrescentado, tais como os polissacarídeos alginato, laminarina, fucoïdanos e compostos fenólicos, em especial florotaninos, descritos na revisão de Balboa et al. (2013). Os florotaninos são uma classe de polifenóis exclusiva de macroalgas que tem ganho interesse nos últimos anos dada a suas propriedades e efeitos terapêuticos pela sua atividade antioxidante, atividade antidiabética, antitumoral, entre outras descritas em Catarino et al. (2017). Efetivamente as algas castanhas possuem um enorme potencial como fonte de compostos bioativos com ação antioxidante (Balboa et al., 2013), havendo vários estudos descritos na literatura acerca da caracterização de extratos de *Fucus* e avaliação do seu potencial. No estudo de Zaragozá et al. (2008) os autores efetuaram um estudo *in vitro* e *ex vivo* de dois extratos de *Fucus vesiculosus* que

apresentaram atividade antioxidante e potencial de aplicação na área alimentar sem efeitos tóxicos (Holdt and Kraan, 2011; Zaragozá et al., 2008).

1.3.5. *Gracilaria* sp

As macroalgas vermelhas, embora mais abundantes em águas tropicais, podem também ser encontradas em águas temperadas. Morfologicamente, o talo das algas do género *Gracilaria* tem aparência de uma lâmina cilíndrica e comprimida, irregularmente ramificado, podendo propagar-se vegetativamente (Figura 6). A sua coloração deve-se essencialmente a pigmentos adicionais acessórios, as ficobiliproteínas que, para além de absorverem radiações a diferentes profundidades (Baweja et al., 2016; McHugh, 2003), têm várias aplicações comerciais, tais como corante em vários setores, agente fluorescente, área farmacêutica pelo carácter antioxidante e anti-inflamatório da ficocianina (Sekar and Chandramohan, 2008).

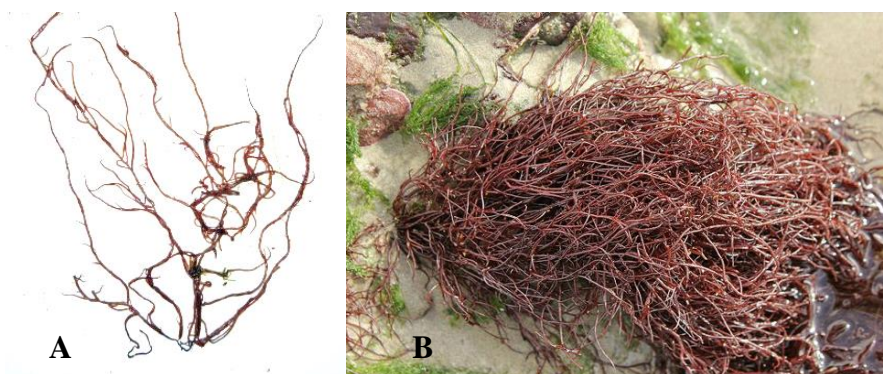


Figura 6. Macroalga vermelha do género *Gracilaria*. (A) foto de MACOI (2008), (B) foto online.

Estas macroalgas devem ser cultivadas em tanques abertos, protegidos de ventos e correntes fortes. Apesar de tolerarem uma vasta gama de salinidades, esta deve ser controlada (normalmente com água do mar). Em paralelo, temperatura, luz e pH são também parâmetros importantes a serem regulados no cultivo destas algas (Pereira and Yarish, 2008), devido ao facto das mesmas necessitarem de uma temperatura da água mínima de 20°C, pelo menos durante 3 meses do ano, para crescerem. Sobrevivem quando cobertas de sedimento (McHugh, 2003)

Segundo a FAO, em 2014, a produção mundial de *Gracilaria* foi de 7 655 milhares de toneladas (FAO, 2016). Na indústria dos ficocolóides, o cultivo de *Gracilaria* tem sido crescente, principalmente na Indonésia, Chile e, em menor escala, na Malásia, Tailândia e China como fonte extrativa de agar (Bixler and Porse, 2011).

1.3.6. *Porphyra dioica*

As macroalgas do género *Porphyra* pertencem ao filo das algas vermelhas (Figura 7). Há cerca de 133 espécies género *Porphyra* dispersas por várias zonas do globo. Destas, algumas foram recentemente reclassificadas como pertencendo ao género *Pyropia* (Sutherland et al., 2011). Em termos morfológicos, estas algas apresentam um talo constituído por uma ou duas camadas de células, conforme as espécies e podem atingir 5 a 35 cm de comprimento (Pereira and Yarish, 2008).



Figura 7. Macroalga vermelha do género *Porphyra*. (A) foto de Pereira (2009), (B) foto de J Brodie e L. M. Irvine, APHOTO website.

Normalmente, as espécies do género *Porphyra* contêm porfiranos, polissacarídeos sulfatados compostos por um complexo de galactanas, com propriedades bioativas como, por exemplo, atividade antitumoral (Holdt and Kraan, 2011).

Segundo a FAO, em 2014, a produção mundial de *Porphyra* (incluindo *Pyropia*) foi de 1 806 milhares de toneladas (FAO, 2016). Durante milénios e até hoje, a macroalga nori, “erva patinha” ou *Porphyra* foi e é amplamente usada para consumo humano no este Asiático (Delaney et al., 2016). A nori é famosa por ser aplicada no sushi, mas também se consume frita ou incorporada em sopas, omeletes ou tortas (Neto et al., 2005).

1.4. Processamento de macroalgas

Tradicionalmente, e na maior parte dos países onde o uso de macroalgas é limitado ao consumo doméstico, a sua colheita é efetuada de forma manual, exceto na Noruega e Reino Unido, onde a apanha é mecânica. Alternativamente, em maiores escalas de produção, como na Noruega, França e Espanha, a colheita é mecânica, com recurso a barcos equipados com sistemas de recolha (Delaney et al., 2016; NetAlgae, 2012). Em qualquer um dos casos,

as macroalgas são sempre sujeitas a lavagem para remoção de outras plantas e epífitos, i.e., pequenos organismos que se desenvolvem ancorados às macroalgas (Baweja et al., 2016).

Dado o elevado conteúdo em água das macroalgas (que as torna num alimento perecível), estas requerem normalmente processamentos adicionais para comercialização. A maior parte das algas são comercializadas secas com cerca de 12 a 15% de humidade (Show et al., 2015), ou alternativamente podem ser salgadas em salga ou salmoura, congeladas e/ou misturadas com condimentos.

1.5. Processo de secagem

A secagem é um dos métodos mais antigos e comuns de processamento de alimentos. Requer um controlo simultaneamente de transferência de calor e massa, sendo influenciado pela composição, geometria, espessura e conteúdo em humidade da matriz alimentar. Uma vez que inibe o desenvolvimento microbiano, este processo contribui significativamente para o aumento do tempo de vida dos alimentos. Contudo, alterações físicas e bioquímicas, desejáveis ou indesejáveis, também podem ocorrer (Ahmed, 2011).

1.5.1. Métodos de secagem

De entre os vários métodos de secagem que podem ser aplicados, a secagem por ar quente (SAQ), por ação da luz solar (SLS) e a liofilização são os mais aplicados nas macroalgas (Kadam et al., 2015).

Apesar de ser a mais sustentável e pouco dispendiosa em custos de equipamento e operação, a SLS é incontrolável, imprevisível e dependente das condições climáticas e do tamanho do dia. Normalmente requer longos tempos de secagem, podendo comprometer a higiene do produto (Chan et al., 1997; Kadam et al., 2015). De acordo com isto, Show et al. (2015) verificou a emissão de um odor desagradável durante o processo lento de SLS, o que sugere a alteração da qualidade do produto, não sendo este processo muito recomendável para a secagem de macroalgas para fins alimentares (Show et al., 2015).

Apesar de também requerer longos períodos de secagem e apresentar elevados custos energéticos, a SAQ é a técnica de secagem mais utilizada na indústria alimentar (Ahmed, 2011; Kadam et al., 2015). No geral esta permite obter produtos desidratados com um prazo de validade grande (mais de 3 anos), mas é um processo que pode ter efeitos drásticos na qualidade do produto final (Kadam et al., 2015), uma vez que após contacto com a superfície, o ar quente aquece todo o material por condução (Ahmed, 2011).

Por outro lado, a liofilização é uma técnica capaz de preservar melhor a qualidade do produto, sendo a mais apropriadas para produtos sensíveis ao calor (Kadam et al., 2015). Nutricionalmente, com a liofilização, consegue-se obter macroalgas mais ricas. Contudo, a capacidade de secagem é menor e os custos do equipamento e operação são elevados, comparativamente com os das SAQ e SLS (Chan et al., 1997). Efetivamente, a cada operação interveniente no processo de liofilização está associado um gasto energético associado à congelação, vácuo, sublimação e condensação (Ratti, 2001), sendo assim esta técnica normalmente utilizada em produtos de valor acrescentado. Em suma, a escolha da técnica de secagem a aplicar numa empresa deve ter em consideração os impactos económicos e ambientais, assim como a finalidade da macroalga processada.

1.5.2. Influência da secagem

a) Propriedades físicas

Os diferentes métodos de secagem produzem impactos em várias propriedades físicas da matriz alimentar. Entre elas, a textura é sempre afetada, consequência do fenómeno de desidratação ou, até mesmo, por desnaturação de proteínas (Perera, 2005). Adicionalmente, a cor também é afetada, dependendo do processo de secagem aplicado. Enquanto a liofilização, pela baixa temperatura que mantém no interior do produto, causa em geral pouca deterioração da cor (Ratti, 2001), a SLS tem normalmente grande impacto na cor das macroalgas, uma vez que a ação direta da radiação degrada as clorofilas (Show et al., 2015). Num estudo efetuado por Neoh et al. (2016), a macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii* apresentou uma coloração branca após secagem por exposição direta ao sol (4 dias a 32° C), uma cor verde clara quando seca por liofilização (-86° C durante 48 horas) e uma cor verde escuro quando seca por SAQ (60° C durante 29 horas), tendo os autores concluído que a secagem por exposição solar possivelmente provoca uma maior degradação de pigmentos que se refletem nas perdas cor. De facto, no estudo de Show et al. (2015), os autores verificaram que a liofilização tem menos impacto nos pigmentos, nomeadamente nas clorofilas. Por outro lado, pelas observações de Chen. (2008), o escurecimento da cor verde da macroalga após SAQ poderá ser resultado das reações de acastanhamento despoletadas pela elevada temperatura de secagem. Note-se que, apesar da *Kappaphycus alvarezii* ser uma

macroalga vermelha, o estudo de Neoh et al. (2016) não descreve o efeito das diferentes técnicas de secagem nas ficobiproteínas.

Outros autores verificaram que a utilização de temperaturas superiores a 60° C na SAQ induziram uma degradação considerável das clorofilas na macroalga *Fucus vesiculosus*. Adicionalmente, Gupta et al. (2011) verificaram que a secagem da macroalga castanha *Himanthalia elongata* por SAQ a temperaturas acima dos 50° C resultou no escurecimento da sua cor em apenas 2 horas, possivelmente devido à maior exposição do pigmento fucoxantina.

b) Macro e micronutrientes

No geral, dados bibliográficos apontam para a degradação de vários nutrientes durante os processos de secagem, sendo o grau de impacto dependente das condições de secagem aplicadas e do tipo de macroalga, entre outros fatores.

Durante a secagem sabe-se que ocorrem perdas de ácido ascórbico e pró-vitamina, não se verificando alterações significativas no conteúdo calórico, fibra, algumas vitaminas e ferro. As proteínas, para além de sofrerem oxidação mediada pela luz ou enzimática e produzir “*off flavors*”, podem desnaturar, alterando a solubilidade e textura dos alimentos (Perera, 2005). Vários estudos demonstraram que a secagem de vários tipos de alimentos não provocou grandes alterações no conteúdo de proteína (Labuza and Tannenbaum, 1972).

Adicionalmente, o calor da secagem pode provocar alterações em outros nutrientes, como os lípidos, nomeadamente por oxidação. A autooxidação é o processo mais comum de ocorrer em alimentos e é mediado por reações em cadeia de radicais livres, por ação do oxigénio atmosférico com os lípidos (Shahidi and Zhong, 2010). Assim como os lípidos, os hidratos de carbono, mediante reações de *Maillard*, também podem gerar compostos corados que afetam a cor e sabor (Perera, 2005). Por outro lado, os minerais, por ocorrerem normalmente em complexos relativamente insolúveis ou estarem ligados a membranas ou outros componentes da matriz alimentar serão, à partida, mais estáveis ao oxigénio e ao aquecimento (Klein and Kurilich, 2000).

Como exemplo da comparação das três técnicas de secagem mais utilizadas em macroalgas, a Tabela 4 resume os dados obtidos por Chan et al. (1997) e Neoh et al. (2016) nas macroalgas *Sargassum hemiphyllum* e *Kappaphycus alvarezii*. Tal como pode ser observado, tanto na *S. hemiphyllum* como na *K. alvarezii*, em geral, os valores relativos ao

conteúdo em cinzas, fibra total, lípidos e proteína não apresentam grandes diferenças entre diferentes processos de secagem (SLS durante 4 dias, SAQ a 60° C durante 15 horas e liofilização -70° C durante 5 dias). Por outro lado, em relação à liofilização, o teor de lípidos totais obtido das duas macroalgas foi significativamente menor nas respectivas amostras secas por SAQ.

Tabela 4. Efeito de diferentes métodos de secagem em alguns parâmetros nutricionais das macroalgas *Kappaphycus alvarezii* e *Sargassum hemiphyllum*. Valores em % por base seca.

	<i>Kappaphycus alvarezii</i> ¹			<i>Sargassum hemiphyllum</i> ²		
	SAQ	SLS	Liofilização	SAQ	SLS	Liofilização
Humidade	10,4	12,7	11,2	7,4	12,4	9,47
Cinzas	49,0	48,9	47,6	21,5	19,6	21,1
Fibra total	5,86	5,68	6,04	56,8	62,9	60,2
Lípidos totais	1,08	1,70	1,63	3,38	3,04	4,42
Proteína bruta	8,63	8,80	8,83	9,76	10,1	9,95

¹ (Neoh et al., 2016), ² (Chan et al., 1997).

Adicionalmente, Magnusson et al. (2014) demonstraram que os métodos de secagem e as condições de cultivo afetaram a composição em lípidos da macroalga verde *Derbesia tenuissima*. Enquanto as amostras liofilizadas apresentaram maior conteúdo em ácidos gordos e com maior grau de insaturação, as macroalgas secas por SLS (entre 21 a 51° C durante 24 horas) e SAQ (75° C durante 24 horas) apresentaram um conteúdo em AGP ω -3 mais baixo, de aproximadamente 40% e 15%, respetivamente. Os resultados são concordantes com o facto de baixas temperaturas e atmosfera livre em oxigénio limitar a oxidação lipídica (Magnusson et al., 2014).

c) Compostos fitoquímicos

Nas macroalgas, os compostos fitoquímicos de maior interesse são os que apresentam atividade antioxidante, como os carotenoides, pigmentos e compostos fenólicos (Klein and Kurilich, 2000). Nos alimentos vegetais, os compostos fitoquímicos podem encontrar-se ligados a moléculas da parede celular, inseridos em organelos ou livres no citoplasma. As técnicas de processamento que degradam a estrutura celular fazem com que os compostos

ligados à parede celular se percam da matriz vegetal, sendo este facto benéfico quando o interesse é a sua extração (Klein and Kurilich, 2000; Leong and Oey, 2012; Priecina and Karklina, 2014).

Relativamente ao impacto das técnicas de secagem, apesar da liofilização ser a técnica que em geral melhor preserva as propriedades do alimento, Leong e Oey (2012) verificaram um conteúdo mais baixo de compostos fitoquímicos (antocianinas, carotenoides e vitamina c) em frutos liofilizados, por comparação com os frescos ou submetidos a aquecimento ou congelamento, tendo os autores sugerido a possibilidade de os compostos fitoquímicos em amostras liofilizadas poderem estar mais propícios à degradação, pela evaporação da camada de água protetora (Leong and Oey, 2012). Segundo Klein e Kurilich (2000), na generalidade dos frutos e vegetais, o ácido ascórbico (ou vitamina C), tocoferóis e carotenoides são afetados pela desidratação, como resultado da exposição a radiação ultravioleta, calor e ar (Klein and Kurilich, 2000).

Em relação aos tratamentos térmicos, por provocarem rutura da parede celular aumentam a exposição dos carotenoides e outros compostos (Priecina and Karklina, 2014). Por SAQ, frutos submetidos a 98°C, durante 10 minutos, apresentaram menor conteúdo em carotenoides relativamente aos frutos frescos (Leong and Oey, 2012), tendo ocorrido também a perda de carotenoides vegetais (Priecina and Karklina, 2014). Neste contexto, tendo em conta que os frutos, vegetais e macroalgas têm a mesma origem vegetal, os efeitos poderão eventualmente ser comparáveis.

Vários estudos demonstraram a importância das variações de condições de SAQ na extração de compostos fenólicos e na atividade antioxidante dos respetivos extratos. Dentro deste contexto, Ling et al. (2015) demonstrou que a macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii* seca a 40° C, durante 24 horas, apresentou maior conteúdo em compostos fenólicos totais, flavonoides, antocianinas, carotenoides e forte atividade antioxidante e redutora, em relação às amostras secas a 80° C durante 24 horas. A mesma tendência foi descrita por Moreira et al. (2016), relativamente à macroalga *Fucus vesiculosus*. Em maior pormenor, os extratos aquosos desta macroalga seca a 35 °C apresentaram um conteúdo fenólico e uma capacidade de inibição do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) aproximadamente 2 vezes superior (15,71 mg/g e 57,7%, respetivamente) ao os extratos equivalentes da macroalga seca a 75°C.

Longos tempos de secagem também afetaram o conteúdo em fitoquímicos e a atividade antioxidante de extratos de macroalgas. Ling et al. (2014) demonstrou uma menor rentabilidade de extração de compostos fenólicos e de potencial antioxidante da macroalga *Kappaphycus alvarezii* quando submetida a processos de secagem mais longos, como a SLS (3 a 4 dias) e a liofilização (2 dias), comparativamente à SAQ (1 dia). Adicionalmente, no estudo de Gupta e seus colaboradores (2011), a macroalga *Himanthalia elongata* seca durante 24 horas teve redução na extração de compostos fenólicos totais em 51% e 29%, quando seca a 25° C e a 40° C, respectivamente, acompanhado pela diminuição do potencial antioxidante quando comparada com a fresca. Segundo os autores, o menor teor em compostos fenólicos a temperaturas mais baixas pode ser resultado do longo período necessário para, a 25° C, se atingir um equilíbrio da humidade semelhante ao equilíbrio que se atinge a 40° C. A oxidação, por consequência da incompleta inativação de enzimas oxidativas a baixas temperaturas de processamento, poderá também ter contribuído para redução do teor de compostos fenólicos (Gupta et al., 2011).

A secagem também influencia os tratamentos posteriores que a macroalga possa sofrer. No estudo de Cox (2011), verificou-se a perda de 85,5% de compostos fenólicos totais após fervura de *Himanthalia elongata* durante 35 minutos a 100° C. A secagem usada como pré-tratamento, durante 12 a 24 horas, não só reduziu o tempo de fervura, como diminuiu as perdas de compostos fenólicos (Cox, 2011).

1.6. Objetivos

As macroalgas são apontadas como os novos “super alimentos” de origem vegetal. Apesar do consumo de macroalgas na Europa ser reduzido comparativamente ao dos países asiáticos, há cada vez maior interesse na sua exploração e integração como um “alimento tradicional”, pela sua riqueza em nutrientes e propriedades bioativas. Neste contexto, torna-se importante compreender possíveis impactos do processamento de secagem nas propriedades físico-químicas e funcionais das macroalgas.

No global, este trabalho dividiu-se em duas etapas principais: 1) numa primeira fase, pretendeu-se estabelecer as velocidades de secagem das macroalgas *Ulva rigida*, *Gracilaria sp*, *Fucus vesiculosus* e *Porphyra dioica*, à temperatura de 25°C, em condições que são aplicadas correntemente na empresa Algaplus. Adicionalmente, o perfil lipídico das macroalgas *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus* secas foi comparado com o das macroalgas quando não sujeitas a secagem por ar quente (controlo), de forma a perceber se nutrientes sensíveis a oxidação poderiam ser afetados por este processamento; 2) numa segunda fase, pretendeu-se avaliar a velocidade de secagem das macroalgas *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus* em diferentes temperaturas (25°C, 40°C e 60°C), bem como clarificar qual o impacto na sua cor e na extração de compostos de interesse, nomeadamente pigmentos, polissacarídeos e compostos fenólicos cuja atividade antioxidante é conhecida.

Como objetivo final, pretende-se que a integração deste conhecimento seja uma ferramenta válida para a otimização das condições do processo de secagem aplicado pela Algaplus Lda, e potenciar a promoção das macroalgas comercializadas.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostras de macroalgas

As macroalgas *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Porphyra dioica* foram cultivadas em regime IMTA na empresa Algaplus Lda, enquanto a alga *Fucus vesiculosus* foi colhida da ria na área da empresa e mantida em tanque de cultivo durante um período mínimo de aproximadamente 1 semana antes do processamento. A *Ulva rigida* em estudo foi cultivada em tanques com fluxo e densidade de cultivo otimizados pela empresa.

Após recolha das algas dos tanques de cultivo, estas foram submetidas a um processo de lavagem maquinizado (construído pela BTL-Indústrias Metalúrgicas Lda), com utilização de água da ria tratada por radiação ultravioleta, para remoção de epífitos e sujidade. O excesso de água foi de seguida removido por centrifugação (FTNON-Food Technology, Noord-oos Nederland BV) a 1500 rpm.

2.2. Secagem das macroalgas em secador industrial a 25°C

As amostras de *Ulva rigida*, *Gracilaria sp*, *Fucus vesiculosus* e *Porphyra dioica* preparadas como indicado na secção anterior foram secas em ambiente industrial, seguindo os procedimentos normais implementados na empresa Algaplus Lda, que envolvem a distribuição das macroalgas por tabuleiros de plástico, que são posteriormente empilhados em forma de torre (cada 20 tabuleiros) (Figura 8A) e colocados a secar a 25°C, no secador de circulação convectiva de ar quente (Frigossistema) (Figura 8B).



Figura 8. Torres de tabuleiros usadas para acondicionar as macroalgas (A) no secador; Porta de entrada do secador e quadro de monitorização (B)

Uma vez que a *Ulva rigida* é a macroalga produzida e vendida em maiores quantidades pela Algaplus, esta foi utilizada no primeiro ensaio de secagem com o intuito

de se estabelecer quais os fatores mais relevantes que podem influenciar o tempo de secagem das macroalgas nas condições aplicadas pela empresa. Este primeiro ensaio (ensaio U1) foi efetuado com 287,7 Kg de *Ulva*, atingindo a carga máxima do secador. A Figura 9 representa o esquema do secador ocupado por 7 linhas de torres de tabuleiros (linhas de retângulos a cinza orientados na horizontal na Figura 9 à direita), linhas essas compostas por 4 torres cada (retângulos a cinza) sendo cada torre de 20 tabuleiros (desenho à esquerda da Figura 9).

Ao longo do processo de secagem, recolheram-se amostras de diferentes níveis de altura das torres de tabuleiros, localizados em diferentes posições no secador. Foram consideradas três posições dentro do secador, nomeadamente perto da porta de saída (PosSD), da zona central (PosCTR) e ao lado da porta de entrada (PosENT). Ainda, de cada torre de tabuleiro foram retiradas amostras de 2 níveis de altura, i.e. inferior (I) e superior (S).

Todas as amostras de macroalgas recolhidas ao longo do processo de secagem foram avaliadas quanto à sua humidade relativa, tal como descrito na secção 2.4. Note-se que humidade de todas as amostras foi avaliada pelo método de secagem em estufa, e de forma complementar, a humidade das amostras da PosSD foram ainda determinadas em tempo real na balança térmica (ML-50, AND) existente na Algaplus.

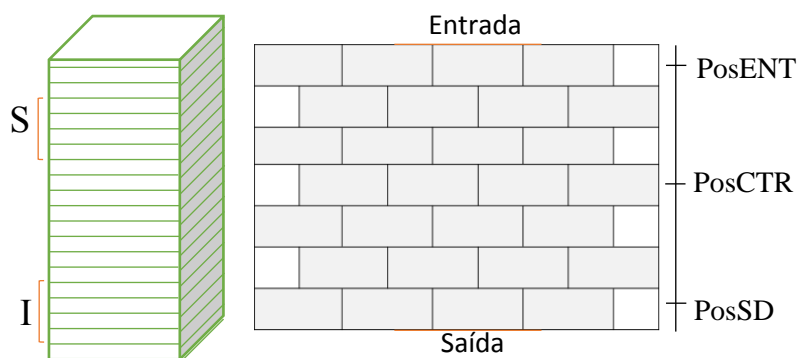


Figura 9. Esquema representativo de: torre de secagem constituída por 20 tabuleiros (à esquerda). S e I indicam as posições superior e inferior, respetivamente; disposição de torres de tabuleiros no interior do secador, na sua capacidade máxima (à direita). Os retângulos a cinza representam torres de tabuleiros e a PosENT, PosCTR e PosSD indicam as posições consideradas para a recolha de amostras).

Para além do ensaio anteriormente descrito, foram ainda efetuados outros dois ensaios de secagem com a macroalga *Ulva rigida*, com menores quantidades de macroalga dentro do secador. Por imposição do normal funcionamento da empresa, foi apenas possível efetuar um ensaio de secagem industrial com as espécies *Gracilaria sp*, *Fucus vesiculosus* e

Porphyra dioica. A Tabela 5 resume as principais condições dos vários testes de secagem efetuados.

As amostras de macroalgas recolhidas ao longo do processo de secagem foram avaliadas quanto à sua humidade relativa pelo método de secagem em estufa, tal como descrito anteriormente. Note-se que ao contrário do ensaio U1, a amostragem das macroalgas nos ensaios restantes (U2, U3, G1, F1e P1) não discriminou os diferentes níveis de altura das amostras na torre, sendo, no entanto, cada amostragem o resultado da junção de porções de macroalgas retiradas das 2 alturas da torre.

Tabela 5. Caracterização do secador nos estudos de secagem industrial.

Teste	Data	Macroalga	Quantidade	Meteorologia *
U1	18/11/2016 Início:8h	<i>Ulva rigida</i> (lote U1.4616)	287,7 Kg de <i>Ulva rigida</i> (capacidade máxima)	Max: 16,8°C Min: 11,3°C Prep: 0 mm
U2 P1	15/02/2017 Início: 15h45	<i>Ulva rigida</i> (lote U1.0717) <i>Porphyra dioica</i> (lote P1.0717)	214,9 Kg total 10,04 kg de <i>Porphyra dioica</i> 1,08 kg de <i>Grateloupia</i> 0,5 kg de <i>Gracilaria sp</i> 0,5 kg de <i>Fucus vesiculosus</i> 202.820 kg de <i>Ulva rigida</i>	Máx: 17,5°C Mín: 10,2°C Prep: 0 mm
U3	02/03/2017 Início: 16h35	<i>Ulva rigida</i> (lote U1.0917)	218,4 Kg total 5,84 Kg de <i>P. umbilicalis</i> 212,16 Kg de <i>Ulva rigida</i>	Máx: 16,3°C Min: 11,8°C Prep: 0 mm
G1 F1	21/03/2017 Início: 17h35	<i>Gracilaria sp</i> (lote G1.1217) <i>Fucus vesiculosus</i> (lote F1.1217)	178,8 Kg total 118,76 Kg de <i>Ulva rigida</i> 30 kg de <i>Fucus vesiculosus</i> 30 kg de <i>Gracilaria sp</i>	Máx: 14,8°C Min: 11,1°C Prep: 0 mm
* Dados do CESAMET: temperatura máxima (Max), temperatura mínima (Min), precipitação (Prep)				

2.3.Secagem de macroalgas em secador laboratorial com diferentes temperaturas

As macroalgas *Ulva rigida* (lote U1.3917), *Gracilaria sp* (lote G1.1217) e *Fucus vesiculosus* (lote F1.1217), tratadas como descrito na secção 2.1, foram secas numa estufa laboratorial com ventilação (series ED115, Binder), com o objetivo de avaliar o tempo de secagem a diferentes temperaturas, assim como o efeito da temperatura de secagem em algumas características físico-químicas das macroalgas e/ou na extração de componentes de

interesse comercial. Para tal, cerca de 300 gramas de macroalgas frescas foram dispersas horizontalmente em grelhas e secas a 25, 40 e 60°C. Durante cada processo de secagem procedeu-se à recolha de amostras para análise de humidade relativa pelo método de estufa, conforme o procedimento descrito na secção seguinte.

2.4.Determinação da humidade relativa das macroalgas

A humidade relativa das macroalgas foi determinada em todas as amostras recolhidas ao longo dos processos de secagem (industrial e laboratorial).

Cerca de 0,5 a 2 g de amostras foram pesadas em cadinhos (ou papel de alumínio) previamente secos a 105°C durante 2 horas, arrefecidos num exsiccador e pesados. Após pesagem, as amostras foram secas a 105° C, durante a noite. O valor da humidade relativa, expresso em percentagem, foi calculado pelo quociente entre a diferença de peso entre as macroalgas antes e depois da secagem ($m_{\text{macroalga}_i}$ e $m_{\text{macroalga}_f}$, respetivamente) e a massa de macroalga inicial, de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ humidade relativa} = \frac{(m_{\text{macroalga}_i} - m_{\text{macroalga}_f})}{m_{\text{macroalga}_i}} \times 100$$

Como método complementar, a determinação da humidade relativa das macroalgas durante a monitorização do processo de secagem industrial (amostras da PosSD) foi simultaneamente realizada na balança térmica (ML-50, AND) existente na empresa Algaplus, que determina a humidade relativa pela diferença entre pesagem inicial e a final após secagem da amostra por uma lâmpada de fluorescência.

2.5.Análises de lípidos totais e perfil de ácidos gordos (macroalgas processadas em secador industrial)

As amostras de macroalgas *Ulva rigida* (lote U1.4616, tanques T1, T2 e T3), *Gracilaria sp* (lote G1.1217) e *Fucus vesiculosus* (lote F1.1217) secas industrialmente foram avaliadas quanto ao seu teor e perfil lipídico e estes comparados com a de amostra não sujeita a secagem por ar quente. Para tal, as macroalgas secas a 25°C e as macroalgas frescas do mesmo lote (controlo) foram congeladas, liofilizadas, e posteriormente moídas em moinho de café e e peneiradas (DIN 4188, Retsch, 0,224 mm).

Cerca de 10g de amostra de macroalga liofilizada e moída foram pesadas num cartuxo de papel de filtro. Este cartuxo foi introduzido num *Soxhlet* e extraído durante 8 horas com 250 mL éter de petróleo. Após extração, o solvente foi filtrado e evaporado até à secura num evaporador rotativo e seco numa estufa durante a noite. O teor em lípidos totais, em percentagem, foi determinado pelo quociente entre peso da fração lipídica após secagem e peso de macroalga.

Para análise do perfil lipídico, a fração lipídica foi ressuspensa em 10 a 12 mL de *n*-hexano com auxílio de ultrassons e armazenada a -20°C sob atmosfera de azoto até análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Atendendo à baixa volatilidade dos lípidos, as amostras foram previamente derivatizadas para conversão dos grupos hidroxilo e carboxilo dos lípidos em grupos derivados de trimetilsililo (TMS), de acordo com o procedimento descrito por Isca et al. (2014). Para tal, a fração lipídica ressuspensa em *n*-hexano foi seca por fluxo de azoto até atingir 20 mg de extrato seco. Posteriormente o extrato seco obtido foi dissolvido em 250 µL de solução padrão de piridina e tetracosano (1,5 mg/mL), seguido da adição de 250 µL de bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamida e 50 µL de trimethylchlorosilano. A sililação ocorreu por reação num banho a 70°C durante 30 minutos.

A análise cromatográfica foi executada por injeção das amostras derivatizadas no equipamento de cromatografia gasosa com espectroscopia de massa (GC-MS), modelo GCMS-QP2010 (Shimadzu) equipado com um auto-injetor AOC-20i e uma coluna DB-5 ms (30 m x 0,25 mm diâmetro, 0,25 µm de espessura). O programa de eluição decorreu numa coluna capilar DB-1 J&W (30 m x 0,32 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme) com hélio (35 cm s⁻¹). A eluição começou a 70°C durante 5 minutos seguido de um aumento da temperatura a 4°C min⁻¹ até os 250°C, a partir dos quais aumentou para 300°C a 2°C min⁻¹, permanecendo a essa temperatura por 5 minutos. A injeção da temperatura foi aos 320°C. A identificação dos compostos foi efetuada com base nos seus derivados TMS comparando o espetro de massa com dados da biblioteca de espectros (NIST 2014; Wiley 2007; Shimadzu Pesticide Library) pelo *GCMSsolution software* (Shimadzu). A calibração foi efetuada pelos compostos de referência puros, representativos das maiores famílias lipofílicas (colesterol para derivados do colesterol, pentadecenol para álcoois de cadeia longa e ácido palmítico para ácidos gordos em geral). As curvas de calibração foram calculadas relativamente ao tetracosano, usado como padrão interno.

2.6. Análises físico-químicas de macroalgas sujeitas a diferentes temperaturas de secagem

As macroalgas *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus* secas à escala laboratorial a 25, 40 e 60 °C foram avaliadas relativamente a diversos parâmetros físico-químicos e comparados com amostras de macroalgas não sujeitas a secagem por calor. Para tal, as macroalgas secas a diferentes temperaturas e as macroalgas frescas do mesmo lote (controlo) foram congeladas e liofilizadas e usadas inteiras (testes de cor superficial e de extração de agar) ou na forma de pó resultante da moagem em moinho de café e passagem por crivo de 0,225 mm (restantes análises).

2.6.1. Cor superficial

As macroalgas inteiras, tanto secas como controlo, foram colocadas em água destilada durante 15 minutos e de seguida dispersas em papel absorvente para remoção do excesso de água. A cor superficial das macroalgas foi medida com recurso a um colorímetro (CM 2300d, Konica Minolta, Japan), tendo-se especial cuidado nas macroalgas *Ulva rigida* e *Fucus vesiculosus* para a não sobreposição de camadas e/ou dobras. Devido à estrutura de finos filamentos da *Gracilaria sp*, a leitura de cor foi efetuada num aglomerado de macroalga. O colorímetro foi calibrado com a cor branca padrão, tendo-se efetuado um mínimo de 6 registos em cada macroalga. A cor foi expressa em coordenadas a^* , b^* e L^* do sistema CIELAB. Neste sistema, as colorações avermelhadas representam-se por valores de a^* positivos, as esverdeadas por valores de a^* negativos, enquanto que valores positivos de b^* indicam cores amareladas e valores negativos cores azuis. A coordenada L^* é uma medida aproximada da luminosidade (Chen, 2008; Granato and Masson, 2010). A diferença de cor foi expressa pela equação:

$$\Delta E = [(a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2 + (L^* - L_0^*)^2]^{1/2}$$

Onde a^* , b^* e L^* são as coordenadas referentes às macroalgas processadas (secas), enquanto a_0^* , b_0^* e L_0^* correspondem às coordenadas das macroalgas não processadas (frescas).

2.6.2. Índice de acastanhamento

O índice de acastanhamento (IA) foi determinado a partir das coordenadas CIE a^* , b^* e L^* , por utilização das expressões abaixo representadas, que são normalmente utilizadas para frutos e vegetais (Cefola et al., 2012; Mohammad et al., 2008).

$$IA = \frac{[100 \times (X - 0,31)]}{0,17} \text{ onde } X = \frac{(a^* + 1,75 \times L^*)}{(5,645 \times L^* + a^* - 3,012 \times b^*)}$$

2.6.3. Extração de pigmentos

a) Extração

Os pigmentos das macroalgas foram extraídos com acetona, na presença de 1% de hidroxitolueno butilado (BHT), durante 24 horas, numa proporção de 1:100 (massa:volume). Note-se que a acetona é um solvente favorável para a extração pigmentos polares de carácter lipídico, como as clorofilas e os carotenoides, mantendo a sua estabilidade (Armeli Minicante et al., 2016; Saati, 2011). Os extratos resultantes foram filtrados por filtro de nylon de porosidade 0,45 μ m (WhatmanTM).

b) Identificação dos pigmentos

A separação dos pigmentos foi feita pelo sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência com um detetor de díodos, acoplada à espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ). Para tal utilizou-se um aparelho Ultimate 3000 (Thermo SCIENTIFIC) equipado com um detetor de fotodíodos (3000RS-DAD), acoplado a um espectrómetro de massa LTQ XL Linear Ion Trap 2D. O sistema cromatográfico consistia numa bomba quaternária, um amostrador automático, um detetor de fotodíodo e um compartimento de coluna termostatzada. A análise foi efetuada com uma coluna Hypersil GOLD (100 mm de comprimento; 2,1 milímetros I.D. e 1,9 mm de diâmetro de partículas) mantida a 30°C, tendo o volume de injeção sido de 2 mL. A fase móvel para a separação dos extratos das macroalgas foi 0,1% ácido fórmico (v/v) (A) e acetronitrilo:metanol (70/30) (B). O gradiente de solvente iniciou com 85% de B, mantendo-se em modo isocrático durante 3,9 min, aumentando de seguida até aos 100% de B em 2,2 min e mantendo essas condições até aos 25 min, seguido do restabelecimento das condições iniciais. Antes da análise por UHPLC, cada extrato ou fração (5 mg) foi filtrado através de

um filtro de nylon com um poro de 0,2 mm (Ge Healthcare Life Sciences, Reino Unido). A taxa de fluxo da corrida foi de 200 mL.min⁻¹. Os dados espectrais de UV-Vis para todos os picos foram recolhidos numa gama de 219-450 nm, tendo os perfis cromatográficos sido registados a 280 nm. O espectrofotómetro de massa usado foi um LTQ XL Linear Ion Trap 2D (Thermo Scientific) equipado com uma fonte de ionização ortogonal de *electrospray* (ESI). As análises foram efetuadas em modo negativo com uma voltagem de 5,00 kV e temperatura do capilar de ESI a 275°C, aplicando-se uma energia de colisão de 20-25 eV nas fragmentações.

c) Quantificação

A leitura da absorvância dos extratos foi efetuada num espectrofotómetro (Shimadzu, UVmini-1240), calibrado com solução de acetona com 1% (volume:volume) de BHT. A quantificação das clorofilas e de carotenoides foi efetuada através das equações descritas por Lichtenthaler (1987), a seguir apresentadas:

$$C_a = 11,24A_{661,6} - 2,04A_{644,8}; C_b = 20,13A_{644,8} - 4,19A_{661,6};$$

$$C_{a+b} = 7,05A_{661,6} + 18,09A_{644,8}; C_c = \frac{1000A_{470} - 1,90C_a - 63,14C_b}{214}$$

Sendo as concentrações de clorofila *a* (C_a), de clorofila *b* (C_b), de clorofila *a+b* (C_{a+b}) e de carotenoides (C_c) expressas em mg/g de macroalga seca.

Adicionalmente, as ficobiliproteínas (pigmentos acessórios característicos das algas vermelhas e cianobactérias) foram extraídas da macroalga *Gracilaria sp* de acordo com o método de Martins et al. (2016), com algumas modificações. O pó das macroalgas, controlo e frescas, resultante da moagem da amostra congelada em azoto líquido, foi extraído com solução tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 6,8, numa proporção 0,1 (massa:volume), durante 30 minutos e sob agitação magnética, à temperatura ambiente e protegida da luz. O extrato resultante foi centrifugado a 6000 rpm a 4°C durante 30 minutos e o sobrenadante foi utilizado para quantificação das ficobiliproteínas por análise do perfil de absorvância entre 400 e 700 nm (representados na Figura 22 do Anexo A). A concentração das ficobiliproteínas aloficocianina (AFC), ficocianina (FC) e ficoeritrina (FE) foram expressas em mg/g a partir das equações de Kursar et al. (1983), considerando a concentração dos extratos aquosos:

$$AFC = 181,3A_{651} - 22,3A_{614}, FC = 151,1A_{614} - 99,1A_{651},$$

$$FE = 155,8A_{498,5} - 40,0A_{614} - 10,5A_{651}$$

2.6.4. Extração de Ulvanas em *Ulva rigida*

A extração das ulvanas foi efetuada de acordo com o método descrito na literatura (Pankiewicz et al., 2016; Trivedi et al., 2016) com algumas adaptações, como esquematizado na Figura 10. Inicialmente procedeu-se a despigmentação de 2g de amostra de seca e controlo de *Ulva rigida* em *soxhlet* por um período aproximado de 2 horas, utilizando diclorometano-acetona (1:1, v/v). O solvente foi descartado e o resíduo da amostra deixado durante a noite na *hotte* para a evaporação do solvente. Após secagem, 0,5g de amostra foram extraídas com 15 mL de água a uma temperatura de 80°C, durante 7 horas sob agitação. Após extração procedeu-se à centrifugação durante 10 min a 6000 rpm e filtração num sistema de vácuo com kitasato e funil de placa porosa 3 para descartar o resíduo e isolar o sobrenadante. A solução extraída foi de seguida tratada enzimaticamente com α -amilase (3000 U/mL, MEGAZYME) para remoção do amido (3 μ L de α -amilase por cada 0,5g de *Ulva rigida* e colocou-se sob agitação leve, durante 60 minutos, à temperatura ambiente ou próximo de 20°C. Após digestão enzimática, o extrato foi centrifugado, o sobrenadante separado e precipitado com etanol (1:4, v/v) durante 3 dias, à temperatura de 4°C. Decorrido este tempo, o precipitado foi recuperado por filtração com filtro de papel e de seguida lavado com etanol a 96 % (v/v) e com acetona. Finalmente o extrato foi seco na estufa durante a noite a uma temperatura de 40°C. O rendimento de extração foi calculado com base no quociente entre a massa de precipitado e a massa inicial de macroalga, em base seca.

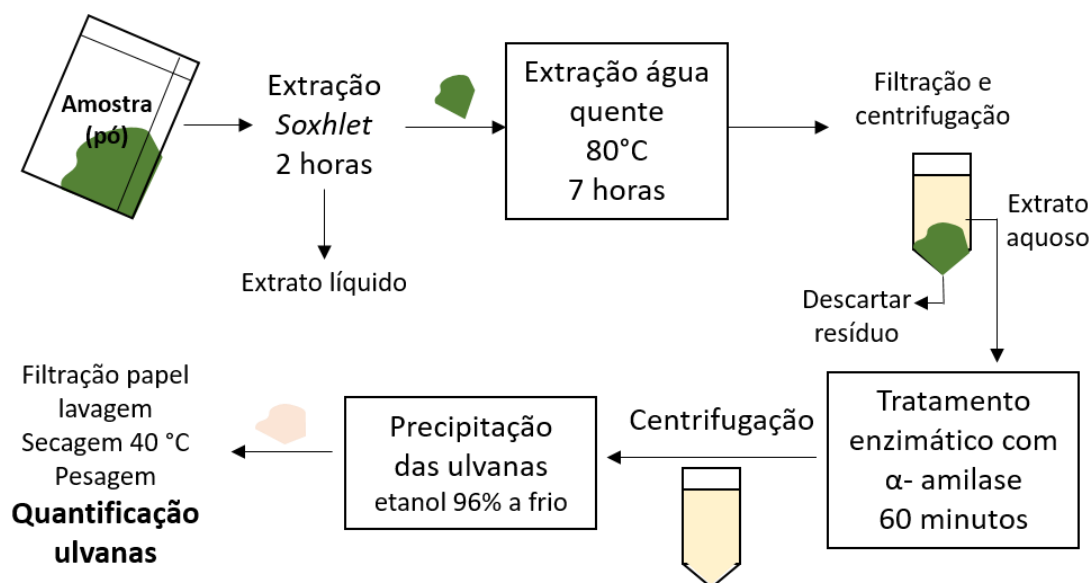


Figura 10. Esquematização do procedimento de extração das ulvanas na *Ulva rigida*.

2.6.5. Extração de Agar em *Gracilaria sp*

A extração de agar foi efetuada a partir da *Gracilaria sp* controlo e seca, tendo por base o método de Kumar and Fotedar (2009). As amostras de macroalga inteiras foram colocadas em água destilada à temperatura ambiente (20°C aproximadamente) durante 1 hora e meia, numa proporção 1:50, seguida de extração num banho de água a $92 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 3 horas. Os filamentos da macroalga foram separados do sobrenadante aquoso por filtração com gaze e algodão. O sobrenadante recolhido foi arrefecido e congelado a -18°C durante a noite para promover a precipitação do agar para posterior quantificação. De seguida o sobrenadante foi descongelado e seco em placas de petri numa estufa 60°C até à secura. O rendimento de extração foi calculado pelo quociente do peso do agar seco e da alga seca, em percentagem:

$$\text{rendimento agar (\%)} = \frac{\text{agar seco (g)}}{\text{alga seca (g)}} \times 100$$

2.7. Extração de compostos fenólicos e avaliação da respetiva atividade antioxidante em *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus*

As macroalgas em pó (aproximadamente 1g) foram extraídas com metanol numa proporção 1:20 (massa de macroalga /volume de metanol) durante 24 horas sob agitação

magnética, à temperatura ambiente e protegidos da luz. Após extração, a mistura foi centrifugada durante 10 minutos a 6000 rpm e o sobrenadante filtrado num filtro de placa porosa G4 sob vácuo. A solução filtrada foi armazenada a -18°C e protegida da luz até análise.

2.7.1. Compostos fenólicos totais

A concentração de compostos fenólicos totais (CFT) nos extratos fenólicos foi estimada pelo método *Folin-Ciocalteu*, como descrito por Machu et al. (2015) com adaptações à microplaca. A cada poço da microplaca foi adicionado 60 µL de água destilada, seguido de 15 µL de reagente de *Folin-Ciocalteu*, 15 µL de amostra. De seguida a microplaca ficou em repouso durante 5 minutos, ao fim dos quais se adicionado 150 µL de solução de Na₂CO₃ com posterior a incubação numa estufa a 30°C durante 60 minutos. Por fim a leitura da microplaca foi efetuada a um comprimento de onda de 750 nm. O ácido gálico (AG) foi usado como padrão e a concentração de CFT foi expressa em mg de equivalentes de AG (EAG)/g de macroalga.

A atividade antioxidante dos extratos de metanol foi determinada pelo método de descoloração do radical ABTS•. A solução stock do radical ABTS• foi preparada pela junção do reagente ABTS (2,2'-azinobis-3-etil- benzotiazoline-6-sulfónico) com uma solução aquosa de K₂S₂O₈ e armazenada no escuro durante 12 a 16 horas à temperatura ambiente (Catarino et al., 2017b; Re et al., 1999). Esta solução foi dissolvida em água destilada até atingir uma absorvância entre 0,75-0,80 a 734 nm (solução ABTS). O ensaio foi efetuado na microplaca com 50µL de amostra/solução padrão aos quais foram adicionados 250µL de solução ABTS. A placa permaneceu no escuro a reagir durante 20 minutos e de seguida foi lida a absorvância a 734 nm. O ácido ascórbico foi usado como padrão e a atividade antioxidante expressa em mg de equivalentes de ácido ascórbico/mL de extrato.

2.8.Tratamento estatístico

A análise estatística dos resultados foi efetuada através do programa *GraphPad Prism*, versão 6.01, utilizando teste T (*Mann-Whitney test*) para comparação de dois grupos e *One-way ANOVA* (*Sidak's multiples comparison test*) para múltiplas comparações, com $\alpha=0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Secagem de macroalgas em ambiente industrial

3.1.1. Determinação da humidade relativa

A humidade das macroalgas é o principal indicador utilizado para monitorizar e confirmar se o seu processo de secagem chegou ao fim, constituindo ainda um fator chave no controle de qualidade das macroalgas uma vez que, para a sua conservação a longo prazo, a humidade destas deve ser mantida abaixo de 12%. Na Algaplus, a humidade relativa das macroalgas é normalmente estimada por balança térmica (ML-50, AND) e, à data de início deste trabalho, esta era operada à temperatura de 80°C. No entanto, quer em termos de rentabilização industrial, quer devido ao enorme número de amostras a analisar durante os processos de secagem industrial planeados neste trabalho, tornou-se importante diminuir o tempo de análise da humidade relativa das macroalgas. Neste contexto, efetuaram-se testes preliminares de leitura de humidade relativa de duas algas diferentes (*Ulva rigida* e *Porphyra dioica*), com operação da balança térmica a 80 e 105°C. Tal como pode ser observado na Tabela 6, os resultados obtidos na balança térmica a operar a estas duas temperaturas não apresentaram diferenças significativas. Por outro lado, o tempo de análise na balança térmica quando operada a 105°C foi mais reduzido, sendo assim mais vantajoso esta condição para a monitorização da secagem em tempo real.

Tabela 6. Efeito da temperatura de medição da balança térmica ML-50 no tempo de análise e no valor da humidade relativa de macroalgas.

Macroalga	Temperatura medição (°C)	Tempo medição (min)	Humidade relativa (%)
<i>Ulva rigida</i>	80	13,5	25,1±1,0 ^a
	105	11,7	21,6±0,4 ^a
<i>Porphyra dioica</i>	80	9,5	12,8±0,5 ^a
	105	6,3	14,7±0,4 ^a

^a Os valores representados são as médias dos triplicados ± desvio padrão. Para a mesma macroalga, letras iguais na mesma coluna indicam valores não significativamente diferentes. Teste T.

Adicionalmente, foram efetuados testes preliminares com a macroalga *Ulva rigida*, para comparação do método de análise de humidade relativa na balança térmica da Algaplus a operar a 105°C, com o método de secagem em estufa, tendo-se concluído que os valores obtidos por estes dois métodos (Tabela 7) não foram significativamente diferentes. Assim, estes dois métodos de análise foram utilizados de forma complementar durante este trabalho.

Tabela 7. Comparação da humidade relativa (%) de *Ulva rigida* determinada por medição na balança térmica e pelo método de estufa.

Humidades relativas de <i>Ulva rigida</i>				
Balança térmica	17,4 ± 0,2 ^a	16,4 ± 1,3 ^a	16,7 ± 0,4 ^a	17,0 ± 1,5 ^a
Estufa	17,8 ± 0,7 ^a	18,0 ± 0,4 ^a	17,7 ± 0,2 ^a	17,0 ± 0,5 ^a

^a Os valores representados são médias de triplicados ± desvio padrão. Letras iguais indicam valores não significativamente diferentes entre colunas (Teste T).

3.1.2. Variáveis da secagem industrial: distribuição horizontal no secador e nível de altura nas torres de secagem

No primeiro ensaio de secagem efetuado com a macroalga *Ulva rigida* (ensaio U1), pretendeu-se clarificar qual a influência da (i) distribuição horizontal das torres no secador, considerando as 3 zonas (PosENT, PosCTR e PosSD) e do (ii) nível de altura das macroalgas nas torres, na sua velocidade de secagem.

A Figura 11 mostra a variação de valores de humidade relativa da *Ulva rigida* ao longo de vários tempos de secagem, para amostras distribuídas nas 3 zonas horizontais do secador, nomeadamente na entrada (Figura 11A, PosENT), na zona central (Figura 11 B, PosCTR) e perto da porta de saída, (Figura 11 C, PosSD), e em 2 níveis de altura da torre de secagem (inferior, I e superior, S).

A análise das curvas de secagem permite verificar a existência de 3 períodos de variação de humidade, tal como referido por Ahmed. (2011), isto é, a fase inicial, onde se prevê o aquecimento gradual do material pelo aumento da temperatura, verificando-se poucas variações da humidade relativa das macroalgas (primeiras 3 a 4 horas de secagem); a fase intermédia em que a água começa a evaporar, verificando-se uma diminuição mais acentuada da humidade relativa (a partir das 4 horas de secagem); e a

fase final, onde se atinge uma humidade relativa mais ou menos constante, com poucas variações, dado a maior parte da água do material ter evaporado (após 15 horas).

Pela análise da Figura 11 verifica-se que, com exceção de algumas variações registadas na fase intermédia do processo de secagem (às 10 horas na PosCTR e 14 horas na PosENT), as humidades relativas das amostras dos níveis de altura extremos (S e I) são próximas entre si. Ainda, os resultados permitiram concluir ter existido um decréscimo mais lento da humidade nas amostras da PosENT, relativamente às da PosCTR e PosSD. Esta observação parece ser visível entre as amostras das PosCTR e PosSD às 10 horas de secagem, por apresentarem valores médios de 47% e 43% de humidade, respetivamente, inferiores aos valores da PosENT à mesma hora, apresentavam, de ainda 70% de humidade. Note-se por exemplo que a humidade das macroalgas na PosSD e PosCTR alcançou os 50% aproximadamente em 10 horas, enquanto que nas das PosENT esse valor foi alcançado em 14 horas.

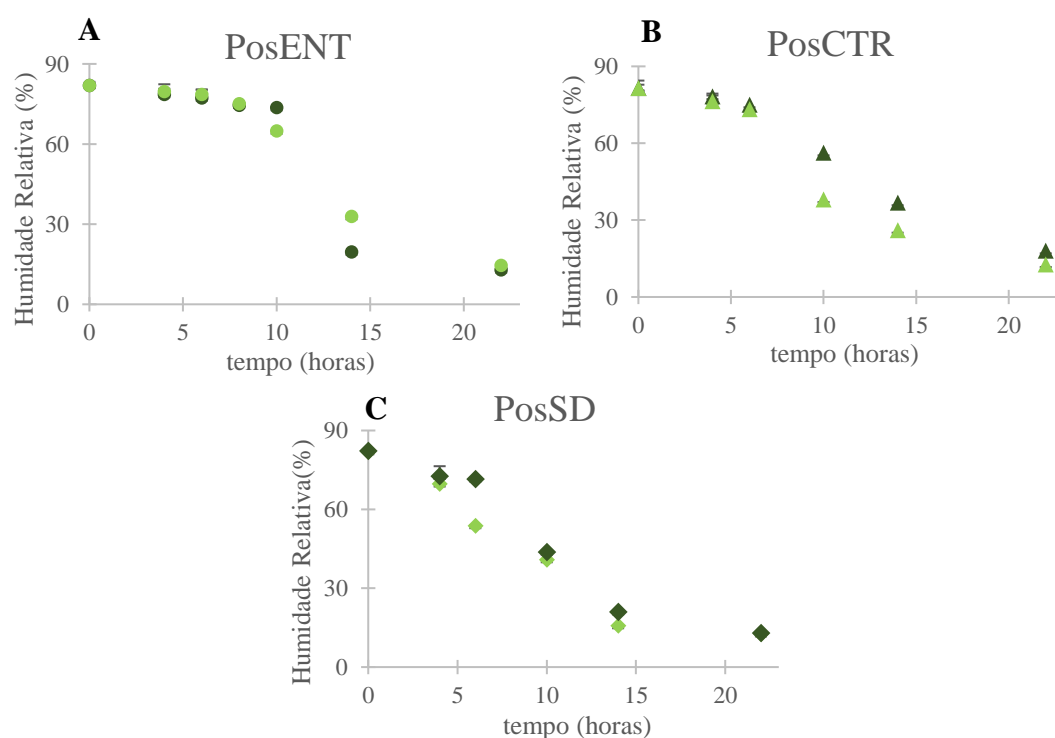


Figura 11. Humidade relativa de *Ulva rigida* ao longo do processo de secagem em diferentes locais do secador. (A) posição de entrada PosENT, ◆◆; (B) posição central PosCTR, triângulos (▲▲); (C) posição de saída, PosSD, círculos (●●); e os níveis de alturas superior (●▲◆) e inferior (●▲◆). Representação dos valores médios de duas medições \pm erro padrão.

As diferentes curvas de secagem obtidas nas 3 posições horizontais do secador comprovaram que efetivamente, a distribuição das torres de tabuleiros tem influência nos tempos de secagem das macroalgas. Globalmente, o primeiro ensaio permitiu realçar a importância da recolha de amostras de macroalgas nas diferentes posições do secador

aquando a monitorizações da secagem por parte da Algaplus, nomeadamente para garantir que todas as macroalgas atingiram uma humidade estável no final do processo. Adicionalmente, por se terem verificado variações de valores de humidade referentes aos níveis de altura extremos da torre do secador, sugere-se que as amostragens de macroalgas devam englobar amostras dos vários níveis de altura.

Os estudos de influência da distribuição horizontal das torres no secador (PosENT, PosCTR e PosSD) na velocidade de secagem foram efetuados mais duas vezes para *Ulva* e uma vez para as restantes macroalgas. A Figura 12 compara a variação de humidade das macroalgas em diferentes ensaios de secagem efetuados na empresa Algaplus para a *Ulva* (U1, U2 e U3, respetivamente), e para a *Gracilaria sp* (G1), *Fucus vesiculosus* (F1) e *Porphyra dioica* (P1). Realça-se o facto de em alguns ensaios não ter sido possível a recolha de amostras em todas as fases da curva de secagem por motivos de restrição de horários de trabalho da empresa.

Os resultados da Figura 12 permitem concluir que, tal como no 1º ensaio de secagem (U1), nos ensaios U2 e U3, a PosSD continuou a ser a zona do secador onde as macroalgas registaram um decréscimo mais acelerado de humidade. A maior variação da humidade foi observada a partir das 4 horas de secagem aproximadamente até às 14 horas. Nesse intervalo de tempo, os valores registados na *Ulva* na PosSD variaram de 69,0% a 18,4% no ensaio U1, de 76,7% para 15,9% no ensaio U2 e de 54,8% a 12,3% no ensaio U3. No entanto, em todas as macroalgas, nas PosENT e PosCTR os valores das humidades das macroalgas às 14 horas de secagem foram superiores aos obtidos nas posições PosSD. Em maior detalhe, no ensaio U1, à mesma hora, as humidades das PosENT e PosCTR foram de 26,2% e 31,5%, respetivamente. A mesma tendência foi observada para outros tempos de secagem em U2 e U3. Por exemplo, às 4 horas de secagem de U2, as macroalgas na PosSD apresentavam 42,6% de humidade, enquanto as da PosCTR e da PosENT eram mais elevadas (77,2% e 85,6%, respetivamente).

A maior velocidade de secagem na PosSD foi também verificada para as restantes macroalgas em foco. Na *Gracilaria sp* (Figura 12 G1) a PosSD demonstrou uma secagem mais acelerada, sendo a humidade às 12 horas de 11,1%. Ao fim deste tempo, a humidade na PosCTR atingiu os 13,3% e na PosENT os 23,1%, valores ainda superiores ao da PosSD. Em *Fucus vesiculosus* (Figura 12 F1), o valor da humidade às 12 horas de secagem na PosSD foi de 14,8%, enquanto que os registados nas PosCTR e PosENT eram de 35,0% e 46,7%, respetivamente. Na secagem de *Porphyra dioica* (Figura 12 P1), os valores de humidade atingidos nas PosCTR e PosENT foram sempre superiores aos

atingidos na PosSD no mesmo intervalo de tempo. Esta observação foi visível logo após 1,5 horas de secagem, com valores inferiores na PosSD (76,5%), face aos 83,3% nas PosCTR e PosENT, até à estabilização da humidade a valores próximos dos 12% a partir das 14 horas de secagem.

Pontualmente foram verificados valores pouco congruentes nas curvas de secagem, isto é, aumentos de humidade entre amostras consecutivas em vez de decréscimo. Estas observações ocorreram nas primeiras 5 horas de secagem (U2 às 3 horas, G1 às 4 horas e F1 às 3 horas) e, podem resultar de influências de procedimentos precedentes ao processo de secagem, em particular o da centrifugação. De facto, a eliminação do excesso de água na superfície das macroalgas depende da carga de macroalgas colocadas no interior da centrifuga, sendo esse um fator que não foi sujeito a controlo durante este trabalho.

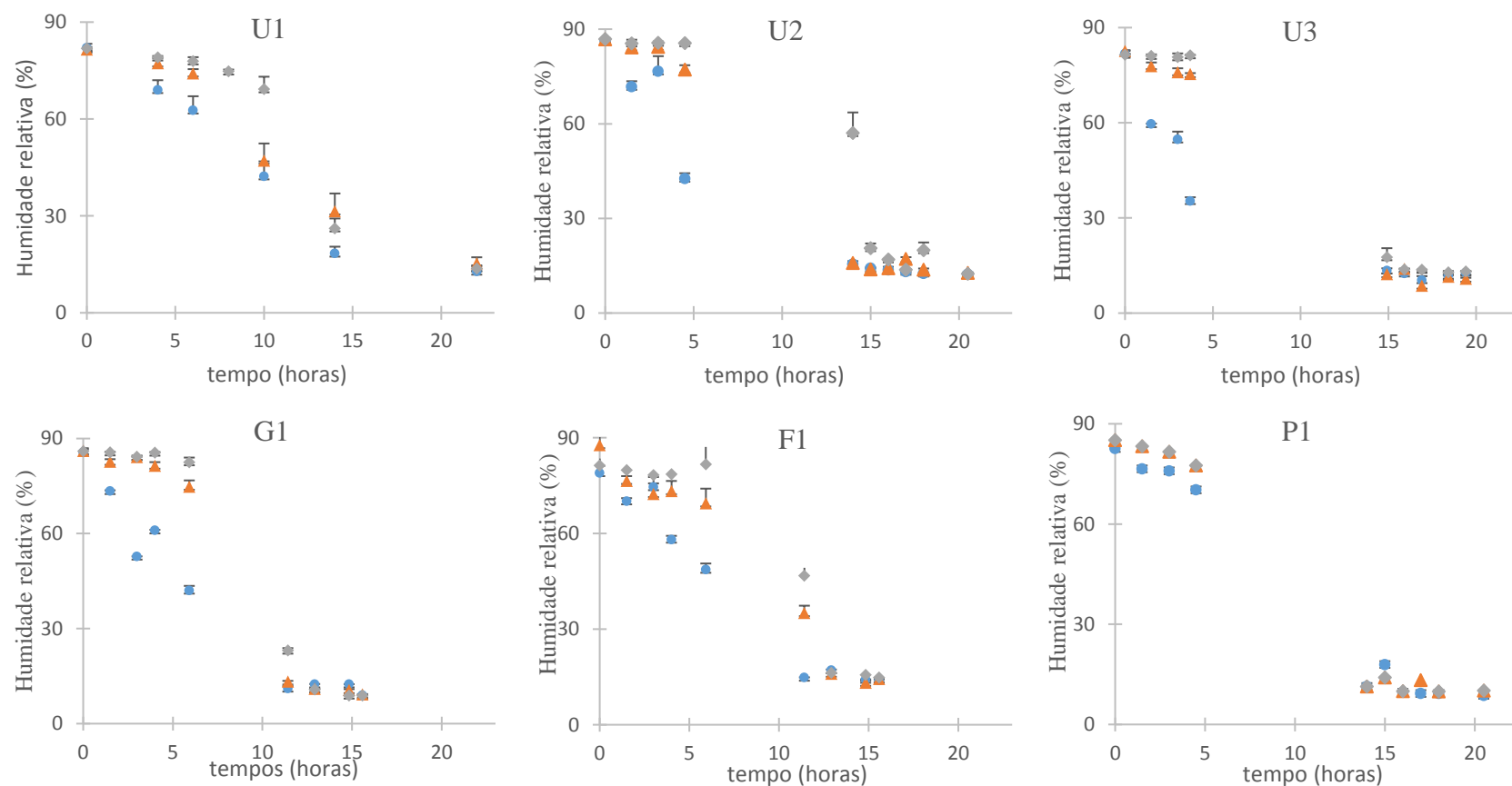


Figura 12. Curvas de secagem de *Ulva rigida*: ensaio U1 (287,7 Kg de macroalga total); U2 (214,9 Kg de macroalga total), U3 (218,4 Kg); *Gracilaria sp* G1(178,8 Kg de macroalga total); *Fucus vesiculosus* F1 (178,8 Kg de macroalga total) e *Porphyra dioica* P1 (214,9 Kg de macroalga total) de acordo com as posições horizontais do secador: posição de saída PosSD (●); posição central, PosCTR (▲); posição de entrada, PosENT (◆); Representação dos valores médios de duas medições \pm erro padrão.

Na Figura 13 são apresentados os valores de humidade relativa das macroalgas para a PosSD nos vários ensaios de secagem U1, U2, U3 e G1, F1 e P1, em simultâneo com os registos de humidade e de temperatura do secador. Por análise da figura, é possível inferir que, tal como a humidade das macroalgas, a humidade do secador decresce ao longo do tempo, embora de forma mais lenta e sem atingir valores inferiores a 20% até às 15 horas. Este decréscimo foi mais acentuado entre as 4 e 15 horas de secagem (tal como se verificou na humidade relativa das macroalgas), sendo esta variação mais visível no gráfico relativo ao ensaio U1, devido à falta de amostragem nos restantes ensaios. Esta observação foi acompanhada pelo aumento da temperatura do ar no interior do secador.

Ainda, a comparação dos três ensaios de secagem de *Ulva rigida* (U1, U2 e U3 com carga total de secador de 287,7 Kg, 214,9 Kg e de 218,4 Kg, respetivamente), permitiu concluir que a quantidade de macroalgas acondicionadas em cada tabuleiro de secagem pode causar variações nas curvas de secagem, possivelmente por influenciar a quantidade de espaços livres através dos quais pode passar o fluxo de ar. A análise da humidade das macroalgas serviu como indicador do tempo de secagem de cada macroalga, considerando os 12% o valor de humidade máximo ideal para uma macroalga seca. De facto, de acordo com a Figura 13, apesar dos valores de humidade inicial das macroalgas serem semelhantes, os valores às 14 horas nos ensaios U2 e U3 foram de 15,5% e 17,9%, respetivamente, enquanto àquele tempo no ensaio efetuado com carga máxima do secador (U1), os valores de humidade ainda só tinham atingido 48,1%. Adicionalmente, os ensaios de secagem efetuados permitiram verificar algumas diferenças entre a velocidade de secagem entre as espécies de macroalgas, que se devem provavelmente às suas diferentes morfologias. Neste contexto, no ensaio com *Porphyra* (P1), efetuado com carga de secador semelhante aos ensaios U2 e U3, verificou-se que a humidade relativa da *Porphyra* às 14 horas (10,2%), era inferior à da *Ulva* em ambos os ensaios U2 e U3. Também nos ensaios G1 e F1 (efetuados com 178,8 Kg de carga), ao fim de 14 horas a humidade de *Gracilaria* era igual à de *Fucus* (11,2%). Mesmo com maior quantidade de macroalgas a humidade de *Porphyra* foi semelhante à de *Gracilaria* e *Fucus*, o que sugere uma maior facilidade de secagem por parte *Porphyra*, em relação às restantes macroalgas. Por comparação dos valores de humidade obtidos em U2 com os de G1 e F1, concluiu-se que tanto a macroalga *Gracilaria* como a *Fucus* secaram mais facilmente que *Ulva*. Nesta linha de pensamento, estas observações permitiram concluir que *Porphyra* é a macroalga que apresenta uma maior velocidade de secagem no processo de SAQ, seguida de *Gracilaria* e *Fucus*, e por último a *Ulva*.

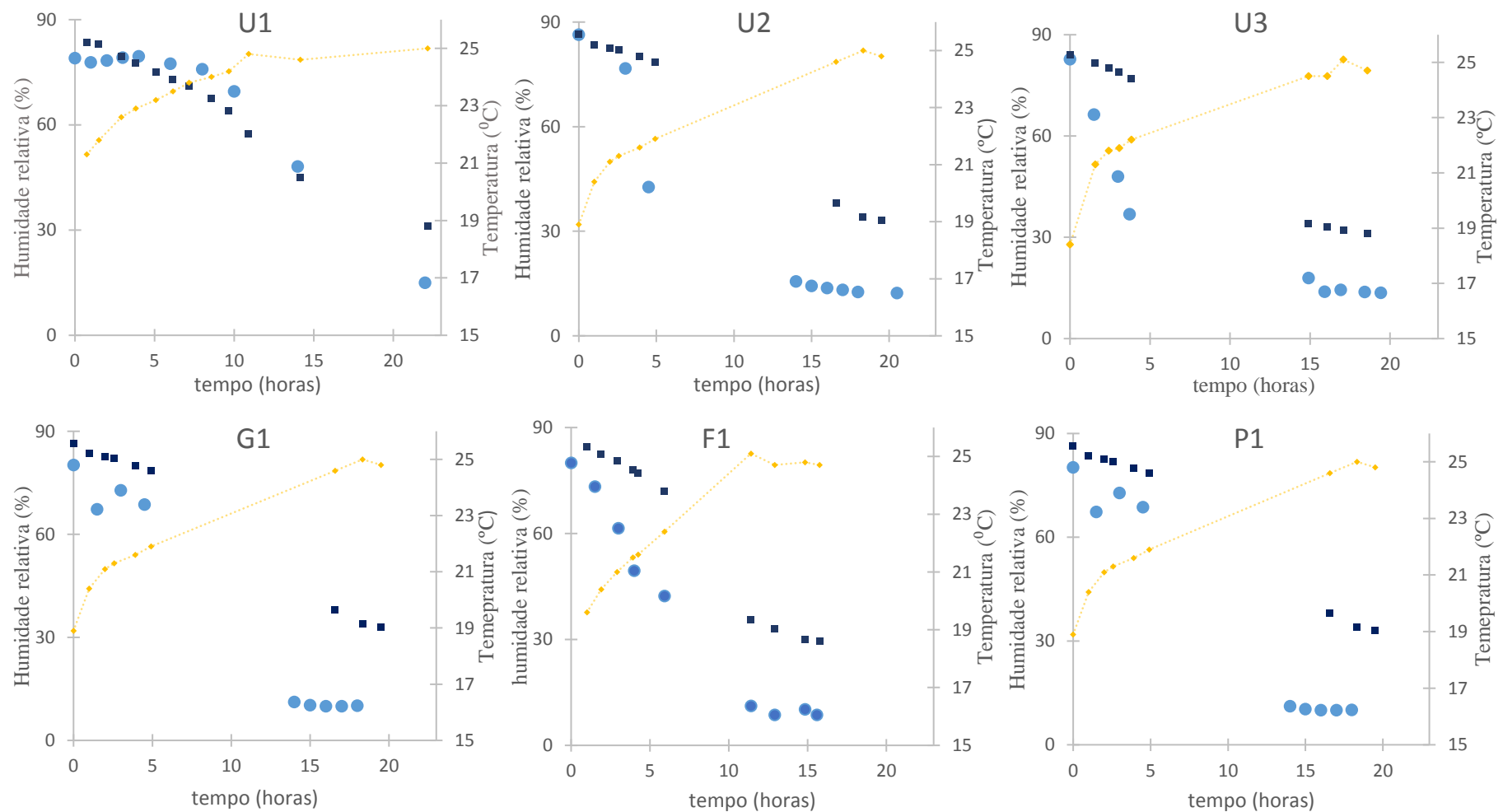


Figura 13. Monitorização da humidade relativa das macroalgas de três ensaios de secagem de *Ulva rigida* (U1, U2 e U3), *Gracilaria sp* (G1), *Fucus vesiculosus* (F1) e *Porphyra dioica* (P1) na torre da PosSD (●) do secador; humidade relativa (■) e temperatura (♦) do ar do secador. Representação dos valores médios de duas medidas \pm erro padrão.

3.2. Impacto da secagem industrial na gordura extraível e no perfil lipídico das macroalgas

3.2.1. Lípidos totais

Tal como mencionado na introdução deste trabalho, a secagem com recurso a calor pode por vezes afetar os parâmetros nutricionais dos alimentos/macroalgas, em particular devido a processos de oxidação. De entre os vários parâmetros nutricionais, os lípidos são bastante suscetíveis à oxidação gerando normalmente compostos que alterarem a cor e o sabor dos produtos alimentares (Perera, 2005). Neste contexto, neste trabalho efetuou-se ainda a análise da gordura e do perfil lipídico das macroalgas *Ulva rigida*, *Fucus vesiculosus* e *Gracilaria sp* secas a 25°C ao nível industrial, e estes valores foram comparados com o dos respetivos lotes de macroalgas não sujeitas a SAQ. A macroalga *Porphyra dioica* não foi incluída neste estudo, uma vez que os parâmetros físico-químicos desta macroalga estão a ser investigados por um outro grupo de investigação.

Na Figura 14 estão representados os teores em lípidos totais extraídos das macroalgas controlo (não sujeitas a SAQ) e secas por SAQ a 25°C. Por comparação do teor de lípidos da figura, verificou-se que *Fucus vesiculosus* foi a macroalga com maior teor de lípidos totais extraídos, comparativamente à *Ulva rigida* e *Gracilaria sp*. Estes resultados estão de acordo com os resultados descritos por vários autores, que demonstraram que as macroalgas castanhas podem apresentar entre 0,5 a 3,1% de lípido totais, valores estes superiores aos teores em lípidos da *Ulva* (0,3 a 1,6%) e *Gracilaria* (0,2 a 3,8%) (Holdt and Kraan, 2011). Ainda, para as 3 macroalgas em estudo, verificaram-se diferenças entre os teores de lípidos totais nas amostras secas por SAQ em relação às da condição controlo. O teor de lípidos totais de *Fucus vesiculosus* foi maior na macroalga seca por SAQ, com $3,94 \pm 0,27\%$, relativamente ao controlo ($2,63 \pm 0,52\%$ de lípidos). Também em *Ulva rigida* a maior extração ocorreu na macroalga seca por SAQ ($1,08 \pm 0,19\%$), face ao controlo ($0,57 \pm 0,18\%$), enquanto que o comportamento oposto foi verificado na *Gracilaria sp* ($1,00 \pm 0,13\%$ e $0,51 \pm 0,11\%$ na amostra controlo e seca por SAQ, respetivamente). Que seja do conhecimento do autor, não existem estudos na literatura que foquem o efeito da SAQ no teor de gordura das macroalgas *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus*.

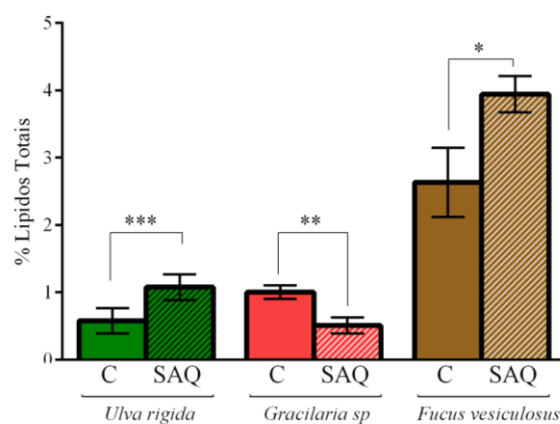


Figura 14. Teor de lípidos totais extraídos nas macroalgas controlo (C) e secas a 25°C (SAQ) de *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus*. Os valores resultam da média de 3 ensaios independentes \pm desvio padrão. Teste T entre controlo e secas, *(P -value<0,05); **(P -value<0,01); ***(P -value<0,001); ns (P -value>0,05).

3.2.2. Perfil lipídico

Os perfis lipídicos representativos das macroalgas *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus* encontram-se representados na Figura 15 e os respetivos resultados de quantificação estão resumidos na Tabela 8.

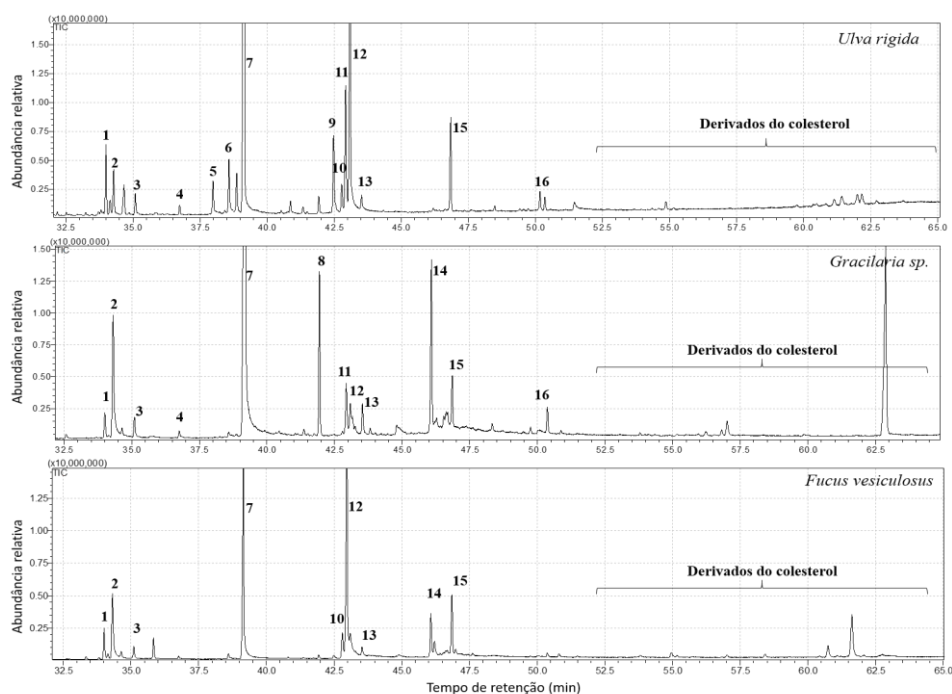


Figura 15. Perfis de lípidos representativos das macroalgas *Ulva rigida*, *Gracilaria sp*. e *Fucus vesiculosus*. Os números representados na Figura correspondem aos identificados na Tabela 8. 15 corresponde ao padrão interno tetracosano.

Pela análise dos perfis lipídicos, é possível afirmar que estes são constituídos por compostos de várias classes, incluindo ácidos gordos saturados (ácido palmítico (7), ácido mirístico (2) e ácido docosahexanóico (5)), ácidos gordos insaturados (ácido oleico (12), ácido araquidónico (14), ácido eicosapentaenóico (9)), diterpenos (fitol e neofitadieno) e alguns derivados de colesterol, entre outros. De entre estes compostos, o ácido palmítico era mais abundante em todas as macroalgas controlo. Por outro lado, os compostos, fitol foi apenas encontrado na Gracilaria, o ácido linoleico na *Ulva rigida* e o ácido araquidónico na Fucus e Gracilaria. Ainda o ácido docosahexanóico e o ácido palmitoleico foram detetados em concentrações elevadas na Ulva, enquanto que na Gracilaria e Fucus foram detetados apenas em quantidades vestigiais. Todos estes compostos já foram identificados por vários autores nas macroalgas em questão (*Ulva rigida*, Gracilaria e *Fucus vesiculosus*) Santos et al. (2015).

Ao nível do efeito da secagem na concentração de compostos extraídos verificaram-se diferenças entre macroalgas. Pela análise da Tabela 8 foi possível verificar, por comparação das macroalgas submetidas a SAQ, um aumento da concentração de compostos extraídos nas macroalgas *Ulva rigida* e *Fucus vesiculosus*, sendo este aumento visível nos compostos mais abundantes, tais como ácido mirístico, o palmítico, o palmitoleico, o ácido oleico e neofitadieno. Já na *Gracilaria sp*, verificou-se uma diminuição dos compostos extraídos com a secagem, nomeadamente o ácido mirístico, palmítico, araquidónico e fitol. Assim, no geral estes dados são concordantes com os resultados dos lípidos totais (secção anterior), sugerindo que a variação do conteúdo em lípidos extraídos verificados em amostras sujeitas a SAQ, em relação às amostras controlo, é parcialmente justificado pela alteração de extração de ácidos gordos e/ou álcoois de cadeia longa e derivados do colesterol.

Deve-se, no entanto, salvaguardar que os efeitos descritos não implicam necessariamente uma alteração nutricional das macroalgas processadas por SAQ. Uma possível razão para a ocorrência destas alterações pode estar associada à modificação da estrutura morfológica da macroalga que potencie o maior contacto com o solvente de extração e, assim um maior teor de compostos extraídos.

Tabela 8. Concentração de compostos extraídos das frações lipídicas das amostras controle de e secas das espécies *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus*. * quantidades vestigiais. Os valores resultam da média de três medições \pm desvio padrão.

Nº	Concentração (mg/Kg alga base seca)	<i>Ulva rigida</i>		<i>Gracilaria sp</i>		<i>Fucus vesiculosus</i>	
		controle	SAQ	controle	SAQ	controle	SAQ
Saturados							
2	Ác. mirístico	35,21 ± 2,85	41,63 ± 6,35	176,8 ± 28,9	75,45 ± 4,31	303,9 ± 39,3	545,4 ± 3,49
4	Ác. pentadecanóico	8,41± 0,99	8,22 ± 0,79	32,37 ± 13,4	4,50 ± 0,26	10,35 ± 0,94	17,45 ± 1,25
7	Ác. palmítico	1400 ± 11	1634 ± 85	1889 ± 675	929,6 ± 204	860,3 ± 148,0	1274 ± 38,7
13	Ác. esteárico	11,27 ± 0,78	30,54 ± 5,25	58,03 ± 27,99	61,29 ± 26,61	27,15 ± 0,52	26,53 ± 4,46
5	Ác. docosahexanóico	44,86 ± 1,64	107,7 ± 0,47	*	*	15,97 ± 0,03	12,79 ± 2,34
Insaturados							
6	Ác. palmitoleico	61,79 ± 6,73	84,44 ± 8,80	9,16 ± 3,71	11,64 ± 4,85	18,93 ± 1,22	26,17 ± 1,12
12	Ác. oleico	229,8 ± 84,3	343,3 ± 40,9	89,46 ± 46,34	75,2 ± 24,4	1103 ± 70	1479 ± 187
10	Ác. linoleico	29,12 ± 4,42	40,15 ± 15,52	10,39 ± 0,62	136,4 ± 88,4		
11	Ác. α-linolénico	171,6 ± 15,14	180,3 ±37,48		29,29 ± 14,5		
14	Ác. araquidónico	*	*	185,4 ± 130,3	112,9 ± 10,33	164,5 ± 33,4	311,4 ± 122,5
9	Ác. eicosapentaenóico	*	10,22 ± 0,47	16,26 ± 7,65	9,24 ± 5,50	61,59 ± 6,13	125,0 ± 8,75
Ésteres de Ácidos Gordos							
16	1-Monopalmitin,	6,78 ±0,67	1,47 ± 0,99	25,05 ± 0,05	9,582 ± 1,26	12,84 ± 0,80	9,787 ± 0,17
Álcoois de Cadeia Longa							
3	2-Hexadecen-1-ol	87,75 ± 11,11	385,9 ± 30,1	9,92 ± 3,75	5,95 ± 0,03	20,78 ± 5,55	31,02 ± 1,34
Diterpenos							
8	Fitol (derivado)	7,29 ± 0,55	27,49 ± 11,05	296,1 ± 50,2	231,7 ± 63,2		
1	Neofitadieno	64,52 ± 3,24	279,4 ± 6,79	70,24 ± 28,8	52,26 ± 1,21	145,0 ± 49,4	159,4 ± 35,3
Esteróis							
	derivados do colesterol	151,7 ± 5,64	331,5 ± 30,2	444,6 ± 140,2	630,2 ± 34,5	1015 ± 52	1110 ± 158
Outros							
	2-Hexadeceno	14,62 ± 1,32	68,21 ± 10,84			18,31 ± 4,15	23,20 ±6,54
	Ág. saturados (%)	65,3	73,5	87,4	66,0	47,5	52,4
	Ág insaturados (%)	34,7	26,5	12,6	34,0	52,5	47,6

3.3.Secagem das macroalgas à escala laboratorial

Em paralelo à secagem industrial, as macroalgas *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus* foram ainda sujeitas a SAQ à escala laboratorial, às temperaturas de 25, 40 e 60°C, de forma a perceber eventuais efeitos destas condições na secagem ao nível de cor superficial, e na extração de compostos de interesse, nomeadamente pigmentos, polissacarídeos e compostos fenólicos.

A análise das curvas de secagem, representadas na Figura 16, permitiu concluir que as temperaturas de 40 e 60°C aceleraram consideravelmente o processo de secagem, relativamente à de 25°C. Nestas condições, foram apenas necessárias 3,5 horas (60°C) ou 5 horas (40°C) para secar a *Ulva rigida*, considerando o valor de referência de 12% para a secagem. Por outro lado, as macroalgas *Gracilaria* e a *Fucus* secaram em aproximadamente 3 horas, tanto a 40°C como a 60°C. Já a 25°C, foram necessárias mais de 10 horas de secagem para todas as macroalgas em estudo atingirem os 12% de humidade, o que, por razões de horário de trabalho, impossibilitou a recolha de amostras a partir deste tempo e até às 23 horas de secagem. Ao fim de 9 horas a 25°C, a *Ulva* e a *Gracilaria* apresentavam 37,8% e 34,3% de humidade, enquanto a humidade da *Fucus* era ainda de 62,4%. Ao fim de 23 horas apenas a *Gracilaria* apresentava 11,2% de humidade, sendo os valores das outras macroalgas superiores. Também no estudo de Gupta et al.(2011), a secagem da macroalga castanha *Himanthalia elongata* em condições laboratoriais foi mais demorada a 25°C, tendo atingido o equilíbrio de humidade após 8 horas, enquanto que a 40°C este equilíbrio foi atingido em 5 horas (Gupta et al., 2011).

Estas observações permitiram concluir que a secagem a 25°C foi mais eficiente à escala industrial, uma vez que o tempo de secagem à escala industrial, na pior das hipóteses, foi de 14 horas, muito inferior às 23 horas observadas para a escala laboratorial. Note-se que não foi possível uma determinação do tempo de secagem das macroalgas do secador industrial por falta de amostras recolhidas antes das 12 horas (como visível na Figura 13).

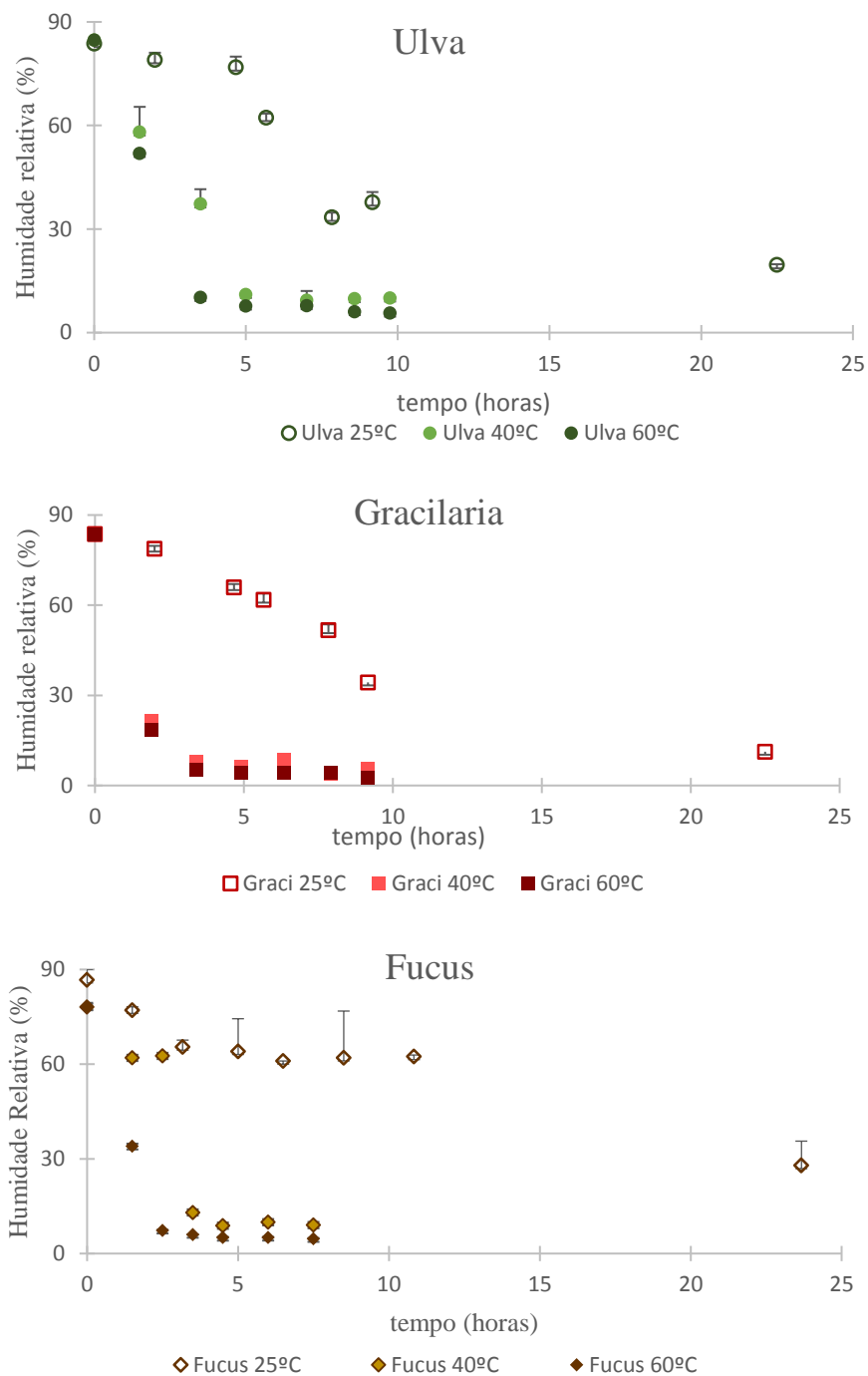


Figura 16. Curvas de secagem de *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus*, realizadas num secador laboratorial de pequena escala a 25, 40 e 60 °C. Os valores resultam da média de duas medições \pm desvio padrão.

3.4. Influência da temperatura de secagem na cor superficial das macroalgas

3.4.1. Cor superficial

Na secagem das macroalgas a cor é uma das características que se prevê ser mais afetada, por consequência dos fenómenos de degradação de pigmentos e desidratação, o que a torna num parâmetro importante na avaliação do impacto da secagem nas características das macroalgas.

Por análise da Figura 17, é possível verificar que, na *Ulva rigida* as coordenadas a^* das várias amostras apresentaram valores negativos, característicos da coloração verde, tendo estes diminuído ligeiramente nas macroalgas secas por SAQ (aproximadamente $-12,1 \pm 0,6$ na seca a 25°C; $-11,6 \pm 0,3$ na seca a 40°C e $-13,6 \pm 0,4$ na seca a 60°C) em relação ao controlo ($-10,2 \pm 0,3$ na fresca), sugerindo um aumento da intensidade coloração verde. Nesta macroalga, as temperaturas mais elevadas de secagem também promoveram o aumento no parâmetro b^* ($44,9 \pm 3,2$ no controlo *versus* $46,1 \pm 2,0$ seca a 25°C; $47,2 \pm 1,7$ seca 40°C e $50,6 \pm 0,6$ seca a 60°C), indicando a maior evidência da tonalidade amarela quando as macroalgas são secas, e em particular com temperaturas de 40 e 60°C. Para estas duas temperaturas, o parâmetro L^* , relativo à luminosidade e face ao controlo, diminuiu significativamente.

De acordo com a sua cor vermelha, a coordenada a^* registada nas amostras de *Gracilaria sp* apresentou valores positivos. Ainda, como pode ser observado na Figura 17, os valores desta coordenada foram significativamente afetados após secagem por SAQ, para todas as temperaturas testadas, variando de $4,9 \pm 0,5$ na condição controlo, para $9,7 \pm 0,8$; $9,3 \pm 1,5$ e $10,9 \pm 0,7$ nas amostras secas a 25, 40 e 60°C, respetivamente. Por outro lado, a coordenada b^* foi menos afetada, apresentando $3,7 \pm 0,5$ na amostra controlo; $5,2 \pm 0,8$ na seca a 25°C, $4,2 \pm 0,5$ na seca a 40°C e $4,7 \pm 0,4$ na seca a 60°C. Já o parâmetro L^* de todas as amostras secas por SAQ foi significativamente mais elevado ($18,5 \pm 0,8$ na seca a 25°C, $18,7 \pm 1,6$ na seca 40 e $18,8 \pm 2,0$ na seca a 60°C) em relação ao controlo ($14,3 \pm 0,9$). A tendência do aumento de a^* assim como de L^* estão de acordo com os resultados do estudo de Paull and Chen. (2008), onde a exposição da *Gracilaria salicornia* à luz e a 21° C resultou numa coloração mais rosa. Uma possível explicação para esta observação pode dever-se ao facto de temperaturas superiores a 20° C promoverem a coloração rosa em paralelo com

degradação das clorofilas e outros pigmentos responsáveis pela coloração verde, durante os tratamentos térmicos (Mohammad et al., 2008).

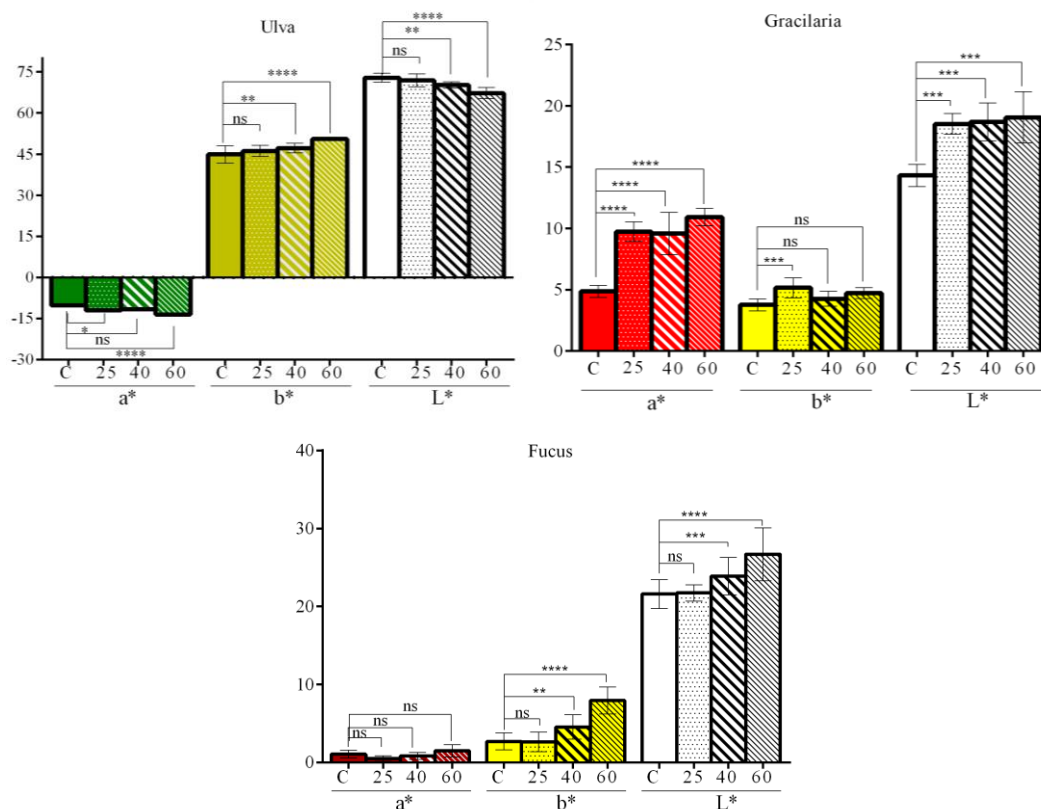


Figura 17. Esquematização gráfica dos parâmetros de cor a^* , b^* e L^* da *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus* na condição controlo (C) e de amostras sujeitas a SAQ a 25°C (25), 40°C (40) e 60°C (60). Os valores resultam da média de triplicados \pm desvio padrão. One-way ANOVA entre controlo e secas (25,40 e 60). *(P -value<0,05); **(P -value<0,01); ***(P -value<0,001); ****(P -value<0,0001); ns (P -value>0,05).

Relativamente à macroalga *Fucus vesiculosus*, os valores registados indicaram que a secagem por SAQ às temperaturas de 40 e 60°C causou um impacto significativo nas coordenadas de cor, com incremento não significativo da coordenada a^* (positiva), mas significativo nas coordenadas b^* e L^* . Em maior detalhe, a coordenada b^* apresentava os valores de $3,8 \pm 1,0$ a 40°C e $7,7 \pm 1,8$ a 60°C, enquanto o controlo era mais baixo ($2,7 \pm 1,1$). Já na coordenada L^* os valores a 40°C e a 60°C foram $23,9 \pm 0,9$ e $26,7 \pm 3,4$, respetivamente, enquanto o do controlo foi de $21,0 \pm 1,3$. Estas observações vão de acordo com o estudo de Moreira e seus colaboradores (2016), que pela análise da cor de *Fucus vesiculosus* moída também verificaram um aumento dos parâmetros b^* e L^* no pó de *Fucus*

vesiculosus após secagem a 60 e 75°C, possivelmente consequentes de reações de acastanhamento (Moreira et al., 2016).

A diferença total da cor (ΔE^*) representa todas as alterações da cor ao nível superficial em função das coordenadas CIE e é usada para avaliar diferenças da cor, face a uma referência. Dependendo dos valores deste parâmetro e segundo a classificação de Adekunle et al. (2010), um $\Delta E^* > 3$ releva muita diferença de cor, enquanto $1,5 < \Delta E^* < 3$ revela alguma diferença e $1,5 < \Delta E^*$ indica que as diferenças são pequenas. Pelos dados representados na Tabela 9 é possível concluir que a secagem provocou alterações na cor superficial das macroalgas em estudo, à exceção da secagem a 25°C na *Fucus vesiculosus* ($\Delta E^* = 0,78$). Uma vez que o valor ΔE^* da *Ulva rigida* seca a 25°C e a 40°C foi de 2,42 e 3,75, respetivamente, os dados permitem afirmar que estas macroalgas possuem diferenças de cor relativamente às macroalgas controlo, sendo essa diferença mais evidente nas amostras secas a 60°C ($\Delta E^* = 8,66$). Na *Gracilaria sp* o valor de ΔE^* entre a macroalga controlo e seca a 25°C foi de 6,63, valor que é também semelhante ao ΔE^* relativo às macroalgas secas a 40°C e 60°C com valores de 6,25 e 7,62, respetivamente. Contudo, nem sempre temperaturas elevadas determinam maiores alterações, uma vez que no estudo de Tello-Ireland et al. (2011), após secagem de *Gracilaria* a 40, 50, 60 e 70°C, verificaram uma maior diferença de cor a 50°C e menores a 60 e 70°C (Tello-Ireland et al., 2011). Na macroalga *Fucus vesiculosus* os valores de ΔE^* seguiram a tendência observada na *Ulva*, isto é, um maior aumento de diferença de cor com o incremento das temperaturas de secagem (valores de ΔE^* de 7,89, 2,23 e 0,78, para amostras secas a 60, 40 e 25°C, respetivamente).

Por comparação dos valores ΔE^* das 3 macroalgas, é possível concluir que, apesar de todas as secagens por SAQ terem impacto na sua cor superficial, a *Gracilaria sp* apresentou efeitos mais drásticos mesmo sujeita a uma baixa temperatura (25°C), sendo por isso a macroalga mais afetada.

Tabela 9. Índice de acastanhamento (IA) e diferenças totais de cor (ΔE^*) das macroalgas *Ulva rigida*, *Gracilaria sp*, e *Fucus vesiculosus* sujeitas a SAQ a diferentes temperaturas.

	<i>Ulva rigida</i>		<i>Gracilaria sp</i>		<i>Fucus vesiculosus</i>	
	IA	ΔE^*	IA	ΔE^*	IA	ΔE^*
Controlo	77,9 \pm 11,2	-	54,7 \pm 6,8	-	15,5 \pm 6,7	-
Seca 25°C	80,8 \pm 9,5 ^a	2,42	68,4 \pm 6,8 ^a	6,63	13,6 \pm 4,1 ^a	0,78
Seca 40°C	87,6 \pm 5,4 ^b	3,75	63,9 \pm 6,0 ^b	6,25	20,9 \pm 4,1 ^a	2,23
Seca 60°C	105 \pm 7 ^c	8,66	66,1 \pm 3,3 ^c	7,62	35,6 \pm 5,8 ^b	7,89

^a Os valores representados são as médias dos triplicado \pm desvio padrão. Para a mesma macroalga, diferentes letras na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes por comparação macroalga seca vs controlo (comparação intracoluna).

O índice de acastanhamento (IA) é outro parâmetro utilizado nos alimentos para informar acerca de reações de acastanhamento que possam ocorrer durante o processamento (como as reações enzimáticas, mediada por enzima como a polifenoloxidase, ou reações não enzimáticas, como as reações de *Maillard* e caramelização), que geram compostos polimerizados de coloração acastanhada (Perera, 2005) e alteram a cor superficial. Pela análise da Tabela 9 é possível concluir que, para as três macroalgas, o IA aumentou para amostras sujeitas a maiores temperaturas de secagem, o que seria de esperar devido às reações de acastanhamento serem normalmente potenciadas pela temperatura. maiores temperaturas de secagem, o que seria de esperar devido às reações de acastanhamento serem normalmente potenciadas pela temperatura. Na *Gracilaria sp* os IA variaram entre as macroalgas secas a diferentes temperaturas, enquanto que em *Ulva rigida* a maior variação se fez sentir com SAQ a 60°C em relação ao controlo (105 \pm 7 e 77,9 \pm 11,2, respetivamente). Já na *Fucus vesiculosus* foi possível verificar um aumento de IA para temperaturas superiores de secagem: 13,6 \pm 4,1 na seca a 25°C para 20,9 \pm 4,1 após secagem a 40°C e 35,6 \pm 5,8 após secagem a 60°C.

3.5. Influência da temperatura de secagem na extração de compostos de interesse

3.5.1. Pigmentos

A Figura 18 representa os perfis cromatográficos representativos das macroalgas *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus*, a 655 nm e a Tabela 10 resume os dados de LC-MS relativos à identificação dos principais compostos detetados nos cromatogramas.

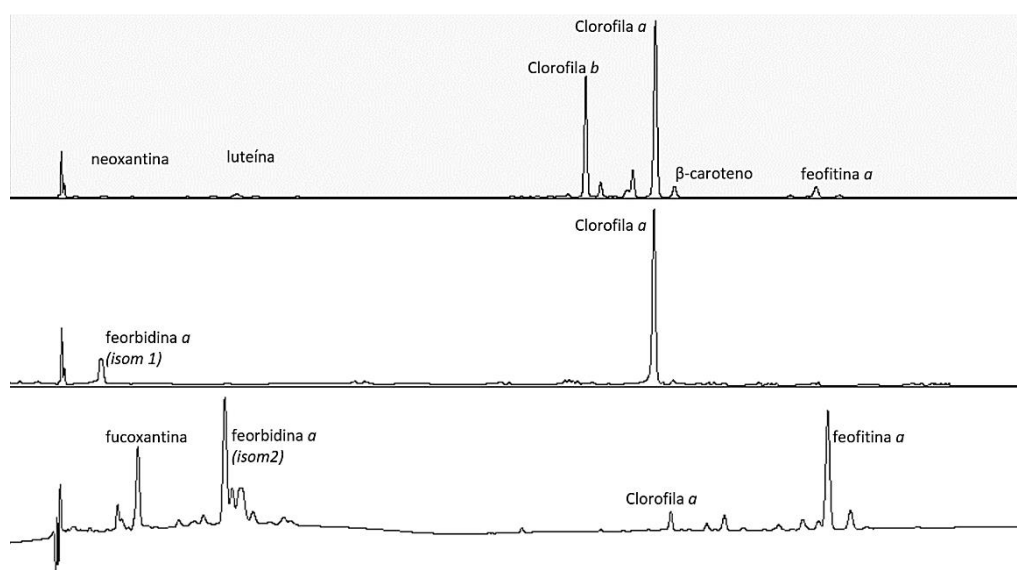


Figura 18. Cromatogramas do extrato de acetona das macroalgas *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus*.

Pela análise dos cromatogramas é possível verificar na macroalga *Ulva rigida* a existência de clorofilas (tanto clorofila *a* como *b*), tal como descrito na introdução deste trabalho, assim como feofitina *a* (pigmento derivado da clorofila) e carotenoides (luteína, neoxantina e β-caroteno). A clorofila *b* não foi identificada na macroalga *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus*, apresentando estas apenas clorofila *a* e produtos derivados (feorbidina *a* e feofitina *a*). Adicionalmente, não se verificou a presença de carotenoides na *Gracilaria*, enquanto na *Fucus vesiculosus* foi apenas identificada a fucoxantina, possivelmente por ser o carotenoide mais abundante nas macroalgas castanhas. Por motivos de indisponibilidade do equipamento LC-MS, a quantificação dos pigmentos das macroalgas neste trabalho foi efetuada por recurso a métodos colorimétricos.

Tabela 10. Dados de UHPLC-DAD-ESI-MSn relativos aos pigmentos identificados no extrato de acetona das macroalgas *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus*.

	Composto	$\lambda_{m\acute{a}x}$	[M-H] ⁺
<i>Ulva rigida</i>	Neoxantina	414, 436, 465	601,5
	Luteína	420, 445, 473	568,5
	Clorofila <i>b</i>	462, 599, 648	907,5
	Clorofila <i>a</i>	430, 617, 663	893,5
	β -caroneto	451, 475	536,5
	Feofitina <i>a</i>	408, 607, 665	871,6
<i>Gracilaria sp</i>	Feorbidina <i>a</i>	408, 608, 664	593,4
	Clorofila <i>a</i>	430, 617, 663	893,6
<i>Fucus vesiculosus</i>	Fucoxantina	448, 465	659,3
	Feorbidina <i>a</i>	408, 607, 665	593,4
	Clorofila <i>a</i>	430, 617, 663	893,6
	Feofitina <i>a</i>	408, 608, 665	871,7

De acordo com a Tabela 11, as clorofilas, principalmente a clorofila *a* e/ou seus derivados (Cla), foram os pigmentos presentes em maior abundância nos extratos de todas as espécies de macroalgas, comparativamente aos carotenoides (Carot). De um modo geral, a partir da análise das Figura 19, é possível concluir que a secagem teve impacto nas quantidades de pigmentos extraídos, embora diferindo na sua tendência. Enquanto na *Ulva rigida* se verificou um aumento do teor de pigmentos extraídos com o incremento da temperatura de secagem, este comportamento foi oposto nas macroalgas *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus*.

Em maior detalhe, na macroalga *Ulva rigida*, a influência da secagem a diferentes temperaturas na extração de pigmentos notou-se nas amostras secas por SAQ a 60°C, com valores de $2,74 \pm 0,20$ mg de Cla/g de macroalga, enquanto para as secas a menores temperaturas não registaram efeitos significativos.

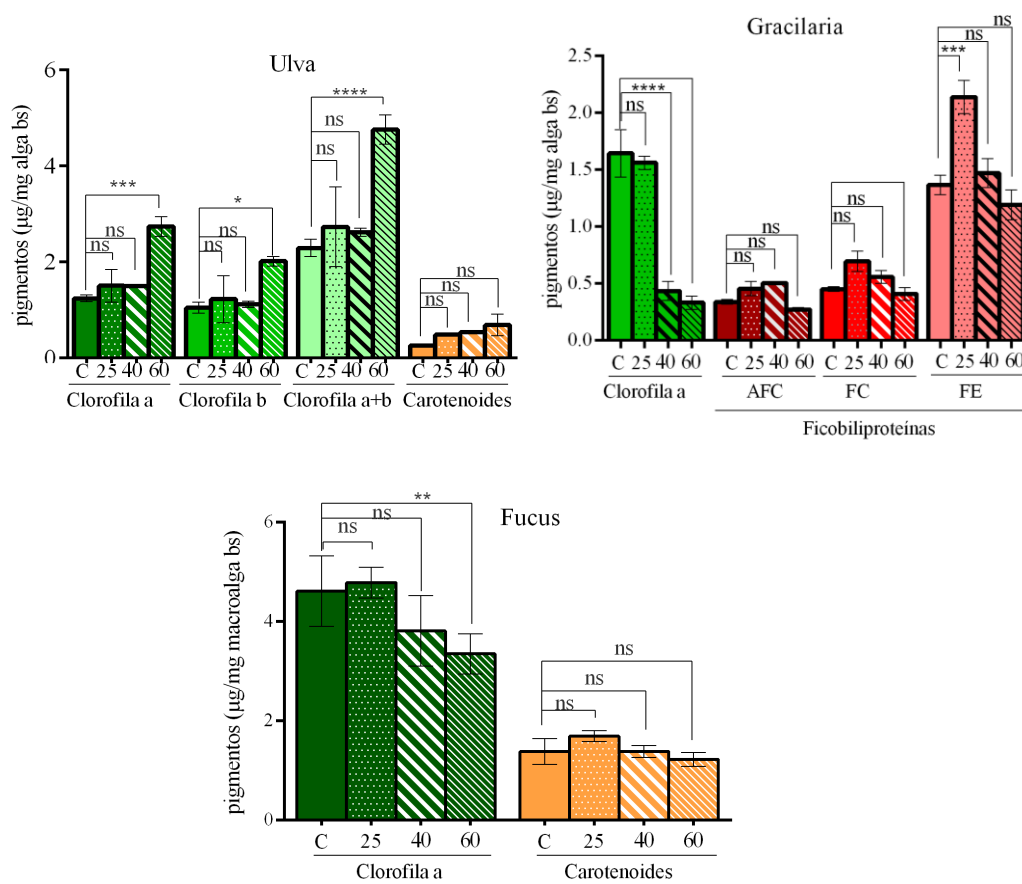


Figura 19. Pigmentos fotossintéticos extraídos nas macroalgas *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus*: na condição controlo (C) e de amostras sujeitas a SAQ a 25°C (25), 40°C (40) e 60°C (60). Os valores resultam da média de três medidas \pm desvio padrão. One-way ANOVA entre controlo e seca (25, 40 e 60); * (P -value < 0,05); ** (P -value < 0,01); *** (P -value < 0,001); ns (P -value > 0,05).

Também na *Fucus vesiculosus*, a temperatura de 25°C não afetou a extração de pigmentos, sendo a clorofila *a* o pigmento mais afetado apenas a temperaturas de secagem superiores, nomeadamente a 60°C ($2,25 \pm 0,40$ mg/g de Cla em relação aos $4,62 \pm 0,70$ mg/g de Cla no controlo).

Em relação à *Gracilaria sp* verificou-se a diminuição dos rendimentos de extração de Cla com temperaturas elevadas, especialmente pela SAQ a 40 e 60°C ($1,64 \pm 0,21$ mg/g de Cla, na amostra controlo comparativamente aos $3,38 \pm 0,71$ mg/g e $2,25 \pm 0,40$ mg/g de Cla na seca a 40 e 60°C, respetivamente).

Adicionalmente, a quantidade de ficobiliproteínas extraídas da macroalga *Gracilaria sp* foi afetada pela temperatura de secagem. Entre as diferentes ficobiliproteínas, a FE foi a mais abundante, tal como descrito em Rodrigues (2013). Ao nível da influência da secagem, a SAQ a 25°C provocou um aumento significativo da FE extraída ($1,37 \pm 0,99$ mg/g de FE

na amostra controlo em relação à $2,37 \pm 0,19$ mg/g de FE na amostra seca a 25°C), tendo o mesmo efeito ocorrido na APC e PC, embora em menor intensidade. No entanto, a quantidade de ficobiliproteínas extraídas nas amostras submetidas a SAQ a 40°C sofreram uma diminuição em relação às das amostras secas a 25°C, sendo este efeito ainda mais acentuado na SAQ a 60°C, atingindo concentrações de ficobiliproteínas extraídas inferiores às obtidas nas amostras controlo.

Tabela 11. Concentração de pigmentos extraídos (em µg/mg de macroalga) de *Ulva rigida*, *Fucus vesiculosus* e *Gracilaria sp.*

macroalga	condições	Concentração pigmentos (mg/g de macroalga)			
		Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a + b</i>	Carotenoides
<i>Ulva rigida</i>	Controlo	$1,24 \pm 0,67$	$1,05 \pm 0,11$	$2,29 \pm 0,18$	$0,26 \pm 0,02$
	Seca 25°C	$1,50 \pm 0,34^a$	$1,23 \pm 0,49^a$	$2,73 \pm 9,83^a$	$0,49 \pm 0,03^a$
	Seca 40°C	$1,50 \pm 0,03^a$	$1,12 \pm 0,06^a$	$2,62 \pm 0,09^a$	$0,54 \pm 0,01^a$
	Seca 60°C	$2,74 \pm 0,20^b$	$2,03 \pm 0,10^b$	$4,76 \pm 0,30^b$	$0,81 \pm 0,09^a$
<i>Fucus vesiculosus</i>	Controlo	$4,62 \pm 0,70$	-	-	$1,39 \pm 0,26$
	Seca 25°C	$4,79 \pm 0,31^a$	-	-	$1,69 \pm 0,11^a$
	Seca 40°C	$3,38 \pm 0,71^a$	-	-	$1,39 \pm 0,12^a$
	Seca 60°C	$2,25 \pm 0,40^b$	-	-	$1,27 \pm 0,14^a$
<i>Gracilaria sp</i>	Controlo	$1,64 \pm 0,21$	-	-	-
	Seca 25°C	$1,56 \pm 0,06^a$	-	-	-
	Seca 40°C	$0,48 \pm 0,007^b$	-	-	-
	Seca 60°C	$0,33 \pm 0,06^b$	-	-	-
<i>Gracilaria sp</i>		Aloficocianina	Ficocianina	Ficoeritrina	
	Controlo	$0,34 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,02$	$1,37 \pm 0,09$	
	Seca 25°C	$0,45 \pm 0,06^a$	$0,69 \pm 0,09^a$	$2,37 \pm 0,19^a$	
	Seca 40°C	$0,46 \pm 0,08^a$	$0,42 \pm 0,06^b$	$1,47 \pm 0,13^b$	
	Seca 60°C	$0,32 \pm 0,08^a$	$0,51 \pm 0,19^b$	$1,19 \pm 0,13^b$	

^a Os valores representados são as médias de 3 ensaios independentes \pm desvio padrão. Diferentes letras indicam valores significativamente diferentes por comparação entre macroalgas controlo vs secas (comparação intracoluna)

As observações efetuadas na *Gracilaria* não foram concordantes com o estudo de Tello-Ireland et al. (2011), onde a extração de FE e FC foi mais elevada na *Gracilaria* seca a 40°C, relativamente à fresca e à seca a 60°C (Tello-Ireland et al., 2011). Estes comportamentos levam a concluir que temperaturas elevadas (a partir dos 40°C) poderão não

acrescentaram melhorias na extração de ficobiliproteínas. Aliás, no presente estudo, a SAQ a 25°C foi a que apresentou mais vantagens, não só por potenciar a extração de ficobiliproteínas como também por não ter provocado diminuições drásticas na quantidade de clorofila *a* extraída. Ainda relacionado com as ficobiliproteínas, outra explicação pode dever-se ao facto da maior ou menor acessibilidade das proteínas na extração estar condicionada pela estrutura morfológica da macroalga, dado que *in vivo* as ficobiliproteínas encontram-se agregadas em estruturas ligadas às membranas dos tilacoides, os ficobilissomas, acabando por estar protegidas por uma parede células de exopolissacarídeos (Kursar et al., 1983; Roy et al., 2011). Assim, as possíveis alterações estruturais e morfológicas provocadas pelo processo de secagem na macroalga podem potenciar a maior extração de compostos. É possível que a natureza proteica das ficobiliproteínas também pode afetar os processos de extração, principalmente pelas temperaturas altas associadas à SAQ, que podem resultar na desnaturação ou degradação de alguns destes pigmentos.

3.5.2. Extração de Agar

O agar é um polissacarídeo gelificante extraído principalmente das macroalgas do género *Gracilaria* e *Gelidium*, sendo a *Gracilaria* a macroalga preferível para a extração do agar de fins alimentar, devido ao seu sucesso de cultivo, constituindo uma vantagem competitiva a nível de produtividade e preço (Bixler and Porse, 2011). Normalmente a extração de agar envolve o cozimento da macroalga em excesso de água ao seu ponto de ebulição e outros tratamentos podem ser aplicados adicionalmente para aumentar a força do gel extraído (Hernández-Carmona et al., 2013). O pré-tratamento alcalino é normalmente utilizado para melhorar a força dos géis extraídos, mas pode afetar negativamente o rendimento de extração de agar (Freile-Pelegrín and Murano, 2005; Kumar and Fotedar, 2009).

No presente estudo, a extração de agar foi efetuada na *Gracilaria sp* sem qualquer pré-tratamento na macroalga fresca (controlo) e nas amostras submetidas a SAQ a 25, 40 e 60°C. Pela análise da Figura 20 os rendimentos obtidos pelas diferentes amostras processadas foram semelhantes entre si, tendo o rendimento mais elevado sido obtido na amostra de SAQ a 40°C ($64,8 \pm 3,1\%$), face às restantes ($63,5 \pm 4,6\%$ no controlo $60,5 \pm 3,9\%$ na seca a 25°C e $58,7 \pm 3,6\%$ na seca a 60°C). Estes resultados sugerem que a secagem a diferentes temperaturas não teve grande efeito na quantidade de agar extraído. Deve ainda

salientar-se que os rendimentos obtidos no presente estudo foram superiores aos descritos por outros autores. Bezerra and Macrinho-Soriano. (2010) descreveram um rendimento de extração de agar de $19,8 \pm 1,6\%$ na *Gracilaria birdiae* também colhida na mesma altura do ano, seca a 60°C e submetida a autoclavagem durante 30 minutos (Bezerra and Marinho-Soriano, 2010). Já em *Gracilaria dura*, após 1 hora de extração a 110°C resultou em $32,0 \pm 0,6\%$ (Marinho-Soriano and Bourret, 2005), enquanto que em *Gracilaria birdiae* seca, moída e extraída durante 1 hora a 90°C , foi obtido um rendimento de $27,2\%$ (Souza et al., 2012). Ainda, em várias macroalgas do género *Gracilaria* os rendimentos de extração obtidos variaram entre 30 e 40% , com extração com água a ferver durante 1 hora e meia (Freile-Pelegrín and Murano, 2005).

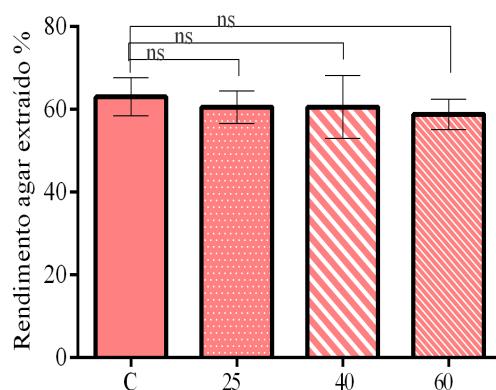


Figura 20. Rendimentos de extração de agar da *Gracilaria* sp. sujeitas a diferentes temperaturas de secagem. Os valores resultam da média de três medidas \pm desvio padrão. One-way ANOVA entre amostras controlo e seca (25, 40 e 60); *($P\text{-value} < 0,05$); **($P\text{-value} < 0,01$); ***($P\text{-value} < 0,001$); ns ($P\text{-value} > 0,05$).

3.5.3. Extração de Ulvanas

As ulvanas são polissacarídeos presentes nas macroalgas verdes pertencentes ao grupo das fibras dietéticas solúveis. Nas macroalgas da ordem taxonómica Ulvales, onde está incluído o género *Ulva*, as ulvanas encontram-se dispersos pelo espaço intercelular e paredes fibrilares das predes celulares (Paradossi et al., 1999). A estrutura química das ulvanas é variável, mas é maioritariamente composta por ramnose, xiloses, ácidos idurónico e ácido glucurónico, sulfatados ou parcialmente sulfatados nos resíduos de ramnose e xilose (Lahaye and Robic, 2007b). Estes polissacarídeos têm ganho especial interesse devido aos efeitos biológicos que lhes foram atribuídos (Alves et al., 2013; Wang et al., 2014), tais como atividade antioxidante, atividade anticoagulante, anti-inflamatória e

imunomoduladora, entre outras. Para além dos efeitos biológicos, possuem capacidade de ligação a metais pesados e podem formar géis termorreversíveis em contacto com catiões de cálcio e ácido bórico (Haug, 1976).

Geralmente os processos de extração das ulvanas são efetuados em soluções aquosas a altas temperaturas (80 a 90°C), podendo atingir rendimentos entre os 8 e 29% por macroalga seca (Lahaye and Robic, 2007b). Ao processo de extração estão normalmente também associados processos de purificação para remoção de contaminantes, tais como lípidos, pigmentos, proteínas e outros polissacarídeos, quer por extração com solventes orgânicos quer por tratamento enzimático, tal como efetuado em Costa et al. (2012).

Com base na Figura 21, é possível concluir que os rendimentos de extração de ulvanas não foram significativamente distintos entre amostra controlo e secas por SAQ a 25, 40 e 60°C, conseguindo-se em geral rendimentos de extração de ulvanas de aproximadamente 32-37% a partir da *Ulva rigida*.

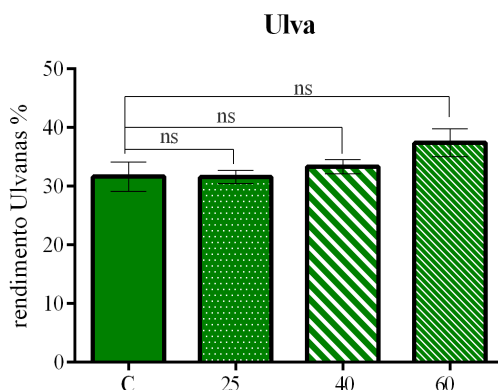


Figura 21. Rendimentos de extração de ulvanas da *Ulva rigida* sujeitas a diferentes temperaturas de secagem. Os valores resultam da média de três medidas \pm desvio padrão. One-way ANOVA entre amostras controlo e seca (25, 40 e 60); *(P -value<0,05); **(P -value<0,01); ***(P -value<0,001); ns (P -value>0,05).

3.5.4. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

Entre os 3 filos de macroalgas, vários estudos consideram as macroalgas castanhas, inclusive a *Fucus vesiculosus*, como as macroalgas mais ricas em compostos fenólicos totais (CFT) e com atividade antioxidante (AcA) apreciável (Holdt and Kraan, 2011; Jiménez-Escrig et al., 2001; Kelman et al., 2012). Contudo, também existem na literatura evidências de maior AcA para as macroalgas verdes, relativamente às vermelhas (Kelman et al., 2012; Matanjun et al., 2008), como descrito por Vijayavel e Martinez (2010), nos extratos de etanol

de *Ulva fasciata* face aos de *Gracilaria salicórnia* (macroalgas recolhidas do Hawaii). No estudo de Matanjun et al. (2008), das oito espécies de macroalgas estudadas, a maior AcA foi registada para macroalgas verdes, seguida das castanhas e vermelhas, assim como o conteúdo em CFT, que se verificou ser maior nas macroalgas castanhas (desde 3,3 e 4,5 mg equivalentes de floriglucinol (EPG)/100 mg extrato seco) e verdes (entre 4,04 e 4,29 mg de EPG/100 mg extrato seco) comparativamente com as vermelhas (1,58 e 2,25 mg EPG/ 100 mg extrato seco) (Matanjun et al., 2008). Mesmo assim, a generalidade as macroalgas do género *Ulva*, apresentam uma AcA inferior comparativamente às macroalgas vermelhas, castanhas e até mesmo às outras espécies de macroalgas verdes (Kelman et al., 2012; Khairy and El-Sheikh, 2015). Assim sendo, o conteúdo em CFT e a AcA foram determinadas apenas nas macroalgas *Gracilaria sp* e a *Fucus vesiculosus*, por serem as macroalgas com mais potencial e aplicabilidade no mercado neste âmbito.

A Tabela 12 apresenta o conteúdo em compostos fenólicos totais (CFT), em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de macroalga, e o IC₅₀ relativos à atividade antioxidante dos extratos de metanol das macroalgas em estudos, expressos em mg/mL de extrato. O IC₅₀ corresponde à quantidade de extrato necessária para eliminar 50% dos radicais ABTS presentes na mistura de reação sendo que, quando mais elevado for o seu valor, menor é a sua atividade antioxidante. Considerando as macroalgas controlo, sem avaliar a influência da secagem, verificou-se um IC₅₀ de $0,029 \pm 0,003$ mg/mL de extrato de *Fucus vesiculosus*, muito inferior aos $3,23 \pm 0,31$ mg/mL da *Gracilaria sp*, demonstrando maior AcA na *Fucus*, como descrito na literatura. Possivelmente a AcA da *Fucus* pode estar relacionada com o elevado conteúdo em CTF (Jiménez-Escrig et al., 2001). De facto e de acordo com a Tabela 12, o conteúdo em CFT nas amostras controlo de *Fucus vesiculosus* foi de $11,3 \pm 0,4$ mg EAG/ g de macroalga, valor bastante superior ao conteúdo em CFT da *Gracilaria sp* em estudo ($2,75 \pm 1,06$ mg EAG/g).

Tabela 12. Conteúdo em compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante dos extratos de metanol de *Gracilaria sp.* e *Fucus vesiculosus* submetidas a diferentes temperaturas de secagem.

condições	<i>Gracilaria sp</i>		<i>Fucus vesiculosus</i>	
	CFT ¹	AcA IC ₅₀ ²	CFT	AcA IC ₅₀
Controlo	2,75 ± 1,06	3,23 ± 0,31	11,3 ± 0,4	0,029 ± 0,003
Seca 25°C	3,96 ± 1,75 ^a	4,03 ± 0,04 ^a	6,85 ± 0,80 ^a	0,066 ± 0,003 ^a
Seca 40°C	2,04 ± 0,54 ^a	5,98 ± 0,29 ^b	6,44 ± 0,29 ^b	0,071 ± 0,018 ^a
Seca 60°C	1,79 ± 0,98 ^a	5,99 ± 0,30 ^b	3,22 ± 0,41 ^c	1,68 ± 0,07 ^b

¹CFT: total de compostos fenólicos, expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/ g macroalga;

²AcA IC₅₀ corresponde à quantidade de extrato necessária para eliminar 50% dos radicais de ABTS, expressa em mg/mL de extrato;

^aCada valor resulta da média de duas réplicas ± desvio padrão. Diferentes letras indicam valores significativamente diferentes por comparação entre macroalgas controlo vs seca (comparação intracoluna).

Adicionalmente os resultados obtidos nas amostras submetidas a SAQ a várias temperaturas demonstram ser afetados pelo processo de secagem. Na macroalga *Gracilaria* o conteúdo em CFT aumentou por SAQ a 25°C, atingindo valores de 3,96 ± 1,75 mg EAG/g de macroalga, acompanhadas também pelo aumento da AcA (4,03 ± 0,04 mg/mL e 3,23 ± 0,31 mg/mL na seca a 25°C e controlo, respetivamente). Curiosamente, a secagem desta macroalga a 40°C causou uma diminuição da extração de CFT sem, no entanto, se notar diferenças na AcA (IC₅₀ de 5,98 ± 0,29 mg/mL na SAQ a 40°C e 5,99 ± 0,30 mg/mL na SAQ a 60°C). Também na macroalga *Fucus vesiculosus*, tanto o teor de CFT como a AcA diminuíram para temperaturas de secagem mais elevadas, atingindo valores mínimos de 3,22 ± 0,41 mg EAG/g de macroalga na secagem a 60°C. Além disso, ao contrário do que foi observado na *Gracilaria*, em *Fucus* a SAQ a 25°C não aumentou o conteúdo de CFT extraídos, refletindo-se no aumento do IC₅₀ de 0,029 ± 0,003 para 0,066 ± 0,003 mg/mL, o dobro nesta condição.

Segundo a literatura, nos extratos aquosos de *Fucus* do estudo de Moreira et al.(2016), o conteúdo em CFT também decresceu de 15,7 ± 0,8 para 9,4 ± 0,7 mg EPG/g de macroalga base seca após secagem a 35 e 60°C, respetivamente, com um abaixamento simultâneo da capacidade de redução do radical de DPPH de 57,7 para 30,8% (Moreira et al., 2016). Outros estudos obtiveram os mesmos efeitos, como o caso da macroalga vermelha *K. alvarezii*, onde o decréscimo dos CFT com a SAQ foi maior aos 80°C relativamente aos

40°C, embora com valores foram próximos ($5,33 \pm 0,07$ para 40°C e $5,19 \pm 0,12$ mg EAG/100 g para 80°C) (Ling et al., 2015). Em *Gracilaria chilensis*, o conteúdo em CFT diminuiu principalmente com a secagem a 40 e 50°C, embora o maior teor de CFT continuasse a permanecer na macroalga seca a 60°C e a AcA foi-se perdendo com as temperaturas de secagem sucessivamente mais altas (Tello-Ireland et al., 2011).

Estas observações permitem concluir que os teores em CFT e AcA são afetados pela temperatura de secagem, especialmente pela SAQ a 60°C, sendo a *Fucus vesiculosus* a macroalga mais afetada.

4. Conclusão

As macroalgas são atualmente consideradas novos “super alimentos”. Nos últimos anos verificou-se um aumento exponencial da sua utilização em várias áreas, incluído ao nível alimentar, tornando-se assim muito importante compreender os possíveis impactos do processamento da secagem nas propriedades físico-químicas das macroalgas.

Os estudos de secagem efetuados em secador industrial (na empresa Algaplus) permitiram concluir que a distribuição horizontal das torres do secador teve influência na velocidade de secagem das macroalgas, verificando-se uma secagem mais acelerada na posição mais próxima da porta de saída (PosSD). Dos estudos de secagem efetuados, a macroalga *Porphyra dioica* foi a que apresentou uma maior velocidade de secagem no processo de SAQ a 25°C, seguida de *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus* e, por fim *Ulva rigida*.

A extração de lípidos totais teve rendimentos superiores nas macroalgas *Ulva rigida* e *Fucus vesiculosus* secas por SAQ a 25°C ($1,08 \pm 0,19\%$ e $3,94 \pm 0,27\%$, respetivamente), relativamente às do controlo ($0,57 \pm 0,18\%$ e $2,63 \pm 0,52\%$), respetivamente, enquanto um comportamento oposto foi verificado na *Gracilaria sp*. Estes resultados foram parcialmente justificados pelo perfil lipídico de cada macroalga, ou seja, verificaram-se maiores quantidade de compostos lipídicos extraídos nas amostras de *Ulva* e *Fucus* submetidas a SAQ, em relação ao controlo, e não se verificou esta tendência na *Gracilaria*. Deste modo, estes resultados permitindo concluir que a SAQ a 25°C promove a extração de compostos lípidos na *Ulva rigida* e *Fucus vesiculosus*, possivelmente por modificar estrutura morfológica da macroalga de tal forma que potencie o maior contacto com o solvente de extração e, assim um maior teor de compostos extraídos.

A partir das curvas de secagem da *Ulva rigida*, *Gracilaria sp* e *Fucus vesiculosus* após SAQ em condições laboratoriais a diferentes temperaturas, foi possível observar que temperatura de 40 e 60°C aceleram consideravelmente o processo de secagem. A *Ulva rigida* secou em 3,5 horas a 60°C e 5 horas a 40°C, enquanto as macroalgas *Gracilaria* e *Fucus* secaram em aproximadamente 3 horas, tanto a 40°C como a 60°C.

A análise das coordenadas de cor das macroalgas submetidas SAQ demonstrou que a cor superficial é significativamente afetada pela secagem, especialmente por SAQ a 40 e 60°C, tendo-se verificado alterações mais drásticas na cor na macroalga *Gracilaria sp*, mesmo quando sujeita a uma baixa temperatura (25°C), por comparação com *Ulva* e *Fucus*.

Pelos valores dos rendimentos de extração de pigmentos foi possível concluir que a extração de carotenoides não foi significativamente afetada pelo processo de SAQ. Em adição, a extração de clorofilas não foi significativamente afetada nas três algas até secagens a 40°C de temperatura. Contudo, SAQ a 60°C aumentou significativamente a extração de clorofilas *a* e *b* (e derivados) na macroalga *Ulva rigida*, e o comportamento oposto foi registado na *Fucus vesiculosus* para clorofila *a* (e/ou derivados) e na *Gracilaria sp.* Nesta macroalga, as quantidades de ficobiliproteínas extraídas também foram afetadas pelo processo de secagem, tendo-se verificado um aumento da quantidade extraída de AFC, FC e FC nas amostras submetidas a SAQ a 25°C, mas uma diminuição a partir dos 40°C de temperatura de secagem.

Por outro lado, a extração dos polissacarídeos agar e ulvanas não foi afetada pela SAQ até aos 60°C nas macroalgas *Gracilaria sp* e *Ulva rigida*, respetivamente. O mesmo não se pode concluir quanto aos CFT extraídos, uma vez que os resultados obtidos demonstraram maior diminuição em *Fucus vesiculosus*, provocada pela SAQ, especialmente após a 60°C (decrécimo para 28,5% do teor em CFT extraídos do controlo), resultando consequentemente também na diminuição da atividade antioxidante.

5. Bibliografia

- Abdala-Díaz, R.T., Cabello-Pasini, A., Pérez-Rodríguez, E., Álvarez, R.M.C., Figueroa, F.L., 2006. Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Marine Biology* 148, 459–465.
- Abreu, M., Pereira, R., Sassi, J., 2014. Marine Algae and the Global Food Industry, in: *Marine Algae*. CRC Press, pp. 300–319.
- Abreu, M.H., Pereira, R., Yarish, C., Buschmann, A.H., Sousa-Pinto, I., 2011. IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: Productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. *Aquaculture* 312, 77–87.
- Abreu, M.H., Varela, D.A., Henríquez, L., Villarroel, A., Yarish, C., Sousa-Pinto, I., Buschmann, A.H., 2009. Traditional vs. Integrated Multi-Trophic Aquaculture of *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, J. McLachlan & E. C. Oliveira: Productivity and physiological performance. *Aquaculture* 293, 211–220.
- Adekunte, A.O., Tiwari, B.K., Cullen, P.J., Scannell, A.G.M., O'Donnell, C.P., 2010. Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry* 122, 500–507.
- Ahmed, J., 2011. Drying of Vegetables: Principles and Dryer Design. *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing* 279–298.
- Aleor, 2014. Aleor [WWW Document]. Aleor rendre possible vos Proj. avec les algues Mar. URL <http://www.aleor.eu/> (accessed 12.8.16).
- Algamar, 2016. Algamar [WWW Document]. Algas Biológicas Certificadas. URL <http://www.algamar.com> (accessed 12.8.16).
- Alves, A., Sousa, R.A., Reis, R.L., 2013. A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *Journal of Applied Phycology* 25, 407–424.
- Armeli Minicante, S., Ambrosi, E., Back, M., Barichello, J., Cattaruzza, E., Gonella, F., Scantamburlo, E., Trave, E., 2016. Development of an eco-protocol for seaweed chlorophylls extraction and possible applications in dye sensitized solar cells. *Journal of Physics D: Applied Physics* 49, 295601.
- Balboa, E.M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E., Domínguez, H., 2013. In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry* 138, 1764–1785.
- Baweja, P., Kumar, S., Sahoo, D., Levine, I., 2016. Biology of Seaweeds, in: *Seaweed in Health and Disease Prevention*. Elsevier, pp. 41–106.
- Benjama, O., Masniyom, P., 2011. Nutritional composition and physicochemical properties of two green seaweeds (*Ulva pertusa* and *U. intestinalis*) from the Pattani Bay in Southern Thailand. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 33, 575–583.
- Bezerra, A.F., Marinho-Soriano, E., 2010. Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil. *Biomass and Bioenergy* 34, 1813–1817.
- Bixler, H.J., Porse, H., 2011. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal of Applied Phycology* 23, 321–335.

- Burlingame, B., 2013. Priority Agriculture- Linkages for Sustainable Diets, IOM Sustainable Diets.
- Catarino, M.D., Silva, A.M.S., Cardoso, S.M., 2017. Fucaceae: A Source of Bioactive Phlorotannins. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1327.
- Catarino, M.D., Silva, A.M.S., Cruz, M.T., Cardoso, S.M., 2017b. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Geranium robertianum* L. decoctions. *Food Function* 8, 3355-3365.
- Cefola, M., D'Antuono, I., Pace, B., Calabrese, N., Carito, A., Linsalata, V., Cardinali, A., 2012. Biochemical relationships and browning index for assessing the storage suitability of artichoke genotypes. *Food Research International* 48, 397-403.
- CEVA, 2014. Réglementation algues alimentaires Synthèse CEVA au 10 / 02 / 2014 3.
- Chan, J.C.C., Cheung, P.C.K., Ang, P.O., 1997. Comparative studies on the effect of three drying methods on the nutritional composition of seaweed *Sargassum hemiphyllum* (Turn) C Ag. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 3056-3059.
- Chen, X.D., 2008. Food drying fundamentals, in: *Drying Technologies in Food Processing*. Blackwell, p. 350.
- Chopin, T., Buschmann, A.H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraemer, G.P., Zertuche-González, J.A., Yarish, C., Neefus, C., 2001. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: A key toward sustainability. *Journal of Phycology* 37, 975-986.
- Copertino, M. da S., Tormena, T., Seeliger, U., 2009. Biofiltering efficiency, uptake and assimilation rates of *Ulva clathrata* (Roth) J. Agardh (Clorophyceae) cultivated in shrimp aquaculture waste water. *Journal of Applied Phycology* 21, 31-45.
- Costa, C., Alves, A., Pinto, P.R., Sousa, R.A., Borges da Silva, E.A., Reis, R.L., Rodrigues, A.E., 2012. Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure. *Carbohydrate Polymers* 88, 537-546.
- Cox, S., 2011. Effect Of Processing Conditions On Phytochemical Constituents Of Edible Irish Seaweed *Himanthalia Elongata* . *Journal of Food Processing and Preseravation* 0-41.
- C-weed, n.d. C-weed [WWW Document]. URL <http://www.c-weed-aquaculture.com/> (accessed 12.8.16).
- Dawczynski, C., Schubert, R., Jahreis, G., 2007. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry* 103, 891-899.
- Delaney, A., Frangoudes, K., Ii, S.-A., 2016. Society and Seaweed, in: *Seaweed in Health and Disease Prevention*. Elsevier, pp. 7-40.
- FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all.
- FAO, 2009. Global agriculture towards 2050, High Level Expert Forum-How to feed the world 2050.
- FAO, IFAD, WFP., 2015. The State of Food Insecurity in the World: Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress., FAO, IFAD and WFP.
- Fiedor, J., Burda, K., 2014. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients* 6, 466-488.
- Fleurence, J., 2016. Seaweeds as Food, in: *Seaweed in Health and Disease Prevention*. Elsevier, pp. 149-167.
- Food Standars Agency, 2016. Current EU approved additives and their E Numbers [WWW

- Document]. Curr. EU Approv. Addit. their E Numbers. URL <https://www.food.gov.uk/science/additives/enumberlist#toc-5>
- Forster, J., Radulovich, R., 2015. Seaweed and food security, in: *Seaweed Sustainability*. Elsevier, pp. 289–313.
- Freile-Pelegrín, Y., Murano, E., 2005. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. *Bioresource Technology* 96, 295–302.
- Fujiwara-Arasaki, T., Mino, N., Kuroda, M., 1984. The protein value in human nutrition of edible marine algae in Japan. *Hydrobiologia* 116–117, 513–516.
- Glazer, A.N., 1971. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *Optics & Laser Technology* 3, 49.
- Granato, D., Masson, M.L., 2010. Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a response surface approach. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 30, 1090–1096.
- Guiry, M.D., n.d. The Seaweed Site: information on marine algae [WWW Document]. *Fucus*. URL <http://www.seaweed.ie/algae/fucus.php> (accessed 10.15.17).
- Gupta, S., Cox, S., Abu-Ghannam, N., 2011. Effect of different drying temperatures on the moisture and phytochemical constituents of edible Irish brown seaweed. *LWT - Food Science and Technology* 44, 1266–1272.
- Haug, A., 1976. The influence of borate and calcium on the gel formation of a sulfated polysaccharide from *Ulva lactuca*. *Acta Chem. Scand. B.* 30, 562–6.
- Haugan, J.A., Liaaen-Jensen, S., 1994. Algal carotenoids 54. Carotenoids of brown algae (Phaeophyceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 22, 31–41.
- Hernández-Carmona, G., Freile-Pelegrín, Y., Hernández-Garibay, E., 2013. Conventional and alternative technologies for the extraction of algal polysaccharides, in: *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Elsevier, pp. 475–516.
- Holdt, S.L., Kraan, S., 2011. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology* 23, 543–597.
- Hortimare, n.d. Hortimare [WWW Document]. Propagating Seaweed a Sustain. Futur. URL <http://hortimare.com/homepage/about-hortimare.html> (accessed 12.8.16).
- Ibañez, E., Cifuentes, A., 2013. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of Science and Food Agriculture* 93, 703–709.
- Isca, V.M.S., Seca, A.M.L., Pinto, D.C.G.A., Silva, H., Silva, A.M.S., 2014. Lipophilic profile of the edible halophyte *Salicornia ramosissima*. *Food Chemistry* 165, 330–336.
- Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Pulido, R., Saura-Calixto, F., 2001. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of Science and Food Agriculture* 81, 530–534.
- Kadam, S.U., Álvarez, C., Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., 2015. Processing of seaweeds, in: *Seaweed Sustainability*. Elsevier, pp. 61–78.
- Kelman, D., Posner, E.K., McDermid, K.J., Tabandera, N.K., Wright, P.R., Wright, A.D., 2012. Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. *Marine Drugs* 10, 403–416.
- Khairy, H.M., El-Sheikh, M.A., 2015. Antioxidant activity and mineral composition of three Mediterranean common seaweeds from Abu-Qir Bay, Egypt. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22, 623–630.

- Kim, M.-K., Dubacq, J.-P., Thomas, J.-C., Giraud, G., 1996. Seasonal variations of triacylglycerols and fatty acids in *Fucus serratus*. *Phytochemistry* 43, 49–55.
- Klein, B., Kurilich, A., 2000. Processing effects on dietary antioxidants from plant foods. *HortScience* 35, 580–584.
- Koivikko, R., Loponen, J., Honkanen, T., Jormalainen, V., 2005. Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *Journal of Chemical Ecology* 31, 195–212.
- Kraan, S., 2013. Pigments and minor compounds in algae, in: Domínguez, H. (Ed.), *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Elsevier, pp. 205–251.
- Kumar, S., Sahoo, D., Levine, I., 2015. Assessment of nutritional value in a brown seaweed *Sargassum wightii* and their seasonal variations. *Algal Research* 9, 117–125.
- Kumar, V., Fotedar, R., 2009. Agar extraction process for *Gracilaria cliftonii* (Withell, Millar, & Kraft, 1994). *Carbohydrate Polymers* 78, 813–819.
- Kursar, T. a, van der Meer, J., Alberte, R.S., 1983. Light-Harvesting System of the Red Alga *Gracilaria tikvahiae*: II. Phycobilisome Characteristics of Pigment Mutants. *Plant Physiology* 73, 361–369.
- Labuza, T.P., Tannenbaum, S.R., 1972. Nutrient losses during drying and storage of dehydrated foods. *C R C Crit. Rev. Food Technology* 3, 217–240.
- Lahaye, M., Ray, B., 1996. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva “rigida”* (Ulvales, Chlorophyta) — NMR analysis of ulvan oligosaccharides. *Carbohydrate Research* 283, 161–173.
- Lahaye, M., Robic, A., 2007a. Structure and function properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* 8, 1765–1774.
- Lahaye, M., Robic, A., 2007b. Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds. *Biomacromolecules* 8, 1765–1774.
- Leong, S.Y., Oey, I., 2012. Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. *Food Chemistry* 133, 1577–1587.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology* 148, 350–382.
- Ling, A.L.M., Yasir, S., Matanjun, P., Abu Bakar, M.F., 2015. Effect of different drying techniques on the phytochemical content and antioxidant activity of *Kappaphycus alvarezii*. *Journal of Applied Phycology* 27, 1717–1723.
- Mabeau, S., Fleurence, J., 1993. Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Science and Technology* 4, 103–107.
- MacArtain, P., Gill, C.I.R., Brooks, M., Campbell, R., Rowland, I.R., 2008. Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutrition Reviews* 65, 535–543.
- Machu, L., Misurcova, L., Ambrozova, J.V., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., Jurikova, T., 2015. Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules* 20, 1118–1133.
- MACOI, 2008. Portuguese Seaweed website [WWW Document]. URL <http://macoi.ci.uc.pt/galeria.php?page=256> (accessed 12.8.16).

- Magnusson, M., Mata, L., de Nys, R., Paul, N.A., 2014. Biomass, Lipid and Fatty Acid Production in Large-Scale Cultures of the Marine Macroalga *Derbesia tenuissima* (Chlorophyta). *Marine Biotechnology* 16, 456–464.
- Mahadevan, K., 2015. Seaweeds: a sustainable food source, *Seaweed Sustainability*. Elsevier Inc.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79, 727–47.
- Marinho-Soriano, E., Bourret, E., 2005. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). *Bioresource Technology* 96, 379–82.
- Marinho-Soriano, E., Fonseca, P.C., Carneiro, M.A.A., Moreira, W.S.C., 2006. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresource Technology* 97, 2402–6.
- Martins, M., Vieira, F.A., Correia, I., Ferreira, R.A.S., Abreu, H., Coutinho, J.A.P., Ventura, S.P.M., 2016. Recovery of phycobiliproteins from the red macroalga *Gracilaria* sp. using ionic liquid aqueous solutions. *Green Chemistry* 18, 4287–4296.
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N.M., Muhammad, K., Ming, C.H., 2008. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *Journal of Applied Phycology* 20, 367–373.
- McHugh, D.J., 2003. A guide to the seaweed industry, *FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER*.
- Mezghani, S., Bourguiba, I., Hfaiedh, I., Amri, M., 2013. Antioxidant Potential of *Ulva rigida* Extracts: Protection of HeLa Cells Against H₂O₂ Cytotoxicity. *The Biological Bulletin* 225, 1–7.
- Mohamed, S., Hashim, S.N., Rahman, H.A., 2012. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science Technology* 23, 83–96.
- Mohammad, A., Rafiee, S., Emam-Djomeh, Z., Keyhani, A., 2008. Kinetic Models for Colour Changes in Kiwifruit Slices During Hot Air Drying. *World Journal of Agricultural Sciences* 4, 376–383.
- Moreira, R., Chenlo, F., Sineiro, J., Arufe, S., Sexto, S., 2016. Drying temperature effect on powder physical properties and aqueous extract characteristics of *Fucus vesiculosus*. *Journal of Applied Phycology* 28, 2485–2494.
- Murata, M., Nakazoe, J., 2001. Production and use of marine algae in Japan. *Jarq-Japan Agricultural Research Q.* 35, 281–290.
- Narayan, B., Miyashita, K., Hosakawa, M., 2005. Comparative Evaluation of Fatty Acid Composition of Different *Sargassum* (Fucales, Phaeophyta) Species Harvested from Temperate and Tropical Waters. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 13, 53–70.
- Narayan, B., Miyashita, K., Hosokawa, M., 2006. Physiological effects of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) - A review. *Food Reviews International* 22, 291–307.
- Nelson, M.M., Phleger, C.F., Nichols, P.D., 2002. Seasonal Lipid Composition in Macroalgae of the Northeastern Pacific Ocean. *Botanica Marina* 45.
- Neoh, Y.Y., Matanjun, P., Lee, J.S., 2016. Comparative study of drying methods on chemical constituents of Malaysian red seaweed. *Drying Technology* 34, 1745–1751.
- NetAlgae, 2012. Seaweed Industry in Europe.
- Neto, A.I., Titley, I., Raposeiro, P.M., 2005. *Flora Marinha do Litoral dos Açores*.

- Ocean Approved, n.d. Kelp, the Virtuous Vegetable [WWW Document]. URL <http://www.oceanapproved.com/> (accessed 1.3.17).
- Ocean Harvest Technology, 2014. Ocean Harvest Technology [WWW Document]. URL <http://oceanharvest.ie/> (accessed 12.8.16).
- Pal Singh, I., Bharate, S.B., 2006. Phloroglucinol compounds of natural origin. *Natural Product Reports* 23, 558.
- Pankiewicz, R., Łęska, B., Messyasz, B., Fabrowska, J., Sołoducha, M., Pikosz, M., 2016. First isolation of polysaccharidic ulvans from the cell walls of freshwater algae. *Algal Research* 19, 348–354.
- Paradossi, G., Cavalieri, F., Pizzoferrato, L., Liquori, A.M., 1999. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. *International Journal of Biological Macromolecules* 25, 309–315.
- Parjikolaei, B.R., Bruhn, A., Eybye, K.L., Larsen, M.M., Rasmussen, M.B., Christensen, K.V., Fretté, X.C., 2016. Valuable Biomolecules from Nine North Atlantic Red Macroalgae: Amino Acids, Fatty Acids, Carotenoids, Minerals and Metals. *Natural Resources* 7, 157–183.
- Paull, R.E., Chen, N.J., 2008. Postharvest handling and storage of the edible red seaweed *Gracilaria*. *Postharvest Biology and Technology* 48, 302–308.
- Pereira, H., Barreira, L., Figueiredo, F., Custódio, L., Vizetto-Duarte, C., Polo, C., Rešek, E., Aschwin, E., Varela, J., 2012. Polyunsaturated fatty acids of marine macroalgae: Potential for nutritional and pharmaceutical applications. *Marine Drugs* 10, 1920–1935.
- Pereira, L., 2011. A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds, in: Pomin, V.H. (Ed.), *Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses*. Nova Science Publishers, Inc, pp. 15–47.
- Pereira, L., 2009. *Guia Ilustrado das Macroalgas*.
- Pereira, R., Yarish, C., 2008. Mass Production of Marine Macroalgae, in: *Encyclopedia of Ecology*. Elsevier, pp. 2236–2247.
- Perera, C., 2005. Selected Quality Attributes of Dried Foods. *Drying Technology* 23, 717–730.
- Phyco Food, 2014. No Title [WWW Document]. URL <http://www.phycofood.co/> (accessed 12.8.16).
- Priecina, L., Karklina, D., 2014. Natural Antioxidant Changes in Fresh and Dried Spices and Vegetables. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food Biotechnological Engineering* 3001, 492–496.
- Ratti, C., 2001. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering* 49, 311–319.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, a., Pannala, a., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231–1237.
- Renaud, S.M., Luong-Van, J.T., 2006. Seasonal Variation in the Chemical Composition of Tropical Australian Marine Macroalgae. *Journal of Applied Phycology* 18, 381–387.
- Rönnerberg, Olof; Ruokolahti, C., 1986. Seasonal variation of algal epiphytes and phenolic content of *Fucus vesiculosus* in a northern Baltic archipelago. *Annales Botanici Fennici* 23, 317–323.
- Roohinejad, S., Koubaa, M., Barba, F.J., Saljoughian, S., Amid, M., Greiner, R., 2016. Application

- of seaweeds to develop new food products with enhanced shelf-life, quality and health-related beneficial properties. *Food Research International*
- Roy, S., Llewellyn, C., Skartstad Egeland, E., Johnsen, G. (Eds.), 2011. *Phytoplankton pigments: Characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Saati, E.A., 2011. The Solvent Effectiveness on Extraction Process. *Makara Journal of Technology* 15, 5–8.
- Sánchez-Machado, D.I., López-Cervantes, J., López-Hernández, J., Paseiro-Losada, P., 2004. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry* 85, 439–444.
- Santos, S.A.O., Vilela, C., Freire, C.S.R., Abreu, M.H., Rocha, S.M., Silvestre, A.J.D., 2015. Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals. *Food Chemistry* 183, 122–128.
- Saranya, C. et al, 2013. Estimation of Major Pigment Content in Seaweeds Collected From Pondicherry Coast. *The Experiment* 9, 522–525.
- Seakura, n.d. No Title [WWW Document]. URL <http://www.seakura.net/> (accessed 12.8.16).
- Sekar, S., Chandramohan, M., 2008. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology* 20, 113–136.
- Shahidi, F., Zhong, Y., 2010. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews* 39, 4067.
- Show, K.-Y., Lee, D.-J., Mujumdar, A.S., 2015. Advances and Challenges on Algae Harvesting and Drying. *Drying Technology* 33, 386–394.
- Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Martins, J.T., Teixeira, J.A., Coimbra, M.A., Vicente, A.A., 2012. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocolloids* 27, 287–292.
- Stansbury, J; Saunders, P.W.D., 2012. Promoting healthy thyroid function with iodine, bladderwrack, guggal and iris. *ND Journal Compilation* 1, 83–90.
- Sutherland, J.E., Lindstrom, S.C., Nelson, W.A., Brodie, J., Lynch, M.D.J., Hwang, M.S., Choi, H.G., Miyata, M., Kikuchi, N., Oliveira, M.C., Farr, T., Neefus, C., Mols-Mortensen, A., Milstein, D., Müller, K.M., 2011. A new look at an ancient order: Generic revision of the bangiales (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 47, 1131–1151.
- Tello-Ireland, C., Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., López, J., Di Scala, K., 2011. Influence of hot-air temperature on drying kinetics, functional properties, colour, phycobiliproteins, antioxidant capacity, texture and agar yield of alga *Gracilaria chilensis*. *LWT - Food Sci. Technology* 44, 2112–2118.
- Thanh, T.T.T., Quach, T.M.T., Nguyen, T.N., Vu Luong, D., Bui, M.L., Tran, T.T. Van, 2016. Structure and cytotoxic activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva lactuca*. *International Journal of Biological Macromolecules* 93, 695–702.
- Tiwari, B.K., Troy, D.J., 2015a. Seaweed sustainability – food and nonfood applications, in: *Seaweed Sustainability*. Elsevier, pp. 1–6. doi:10.1016/B978-0-12-418697-2.00001-5.
- Tiwari, B.K., Troy, D., 2015b. Seaweed minor constituents, in: *Seaweed Sustainability: Food and*

Non-Food Applications. p. 230.

- Trivedi, N., Baghel, R.S., Bothwell, J., Gupta, V., Reddy, C.R.K., Lali, A.M., Jha, B., 2016. An integrated process for the extraction of fuel and chemicals from marine macroalgal biomass. *Scientific Reports* 6, 30728.
- Vijayavel, K., Martinez, J.A., 2010. In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Two Hawaiian Marine Limu : *Ulva fasciata* (Chlorophyta) and *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta). *Journal of Medicinal Food* 13, 1494–1499.
- Villanueva, R.D., Sousa, A.M.M., Gonçalves, M.P., Nilsson, M., Hilliou, L., 2010. Production and properties of agar from the invasive marine alga, *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 22, 211–220.
- Wang, L., Wang, X., Wu, H., Liu, R., 2014. Overview on Biological Activities and Molecular Characteristics of Sulfated Polysaccharides from Marine Green Algae in Recent Years. *Marine Drugs* 12, 4984.
- White, W.L., Wilson, P., 2015. World seaweed utilization, in: *Seaweed Sustainability*. Elsevier, pp. 7–25. doi:10.1016/B978-0-12-418697-2.00002-7
- World Health Organization, 2016. Media centre Fact sheets [WWW Document]. Obes. overweight. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (accessed 10.23.16).
- Zaragoza, M.C., López, D., P. Sáiz, M., Poquet, M., Pérez, J., Puig-Parellada, P., Màrmol, F., Simonetti, P., Gardana, C., Lerat, Y., Burtin, P., Inisan, C., Rousseau, I., Besnard, M., Mitjavila, M.T., 2008. Toxicity and Antioxidant Activity in Vitro and in Vivo of Two *Fucus vesiculosus* Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7773–7780.

6. Anexos

6.1. Anexo A- Espectro de absorvância dos extratos aquosos de ficobiliproteínas

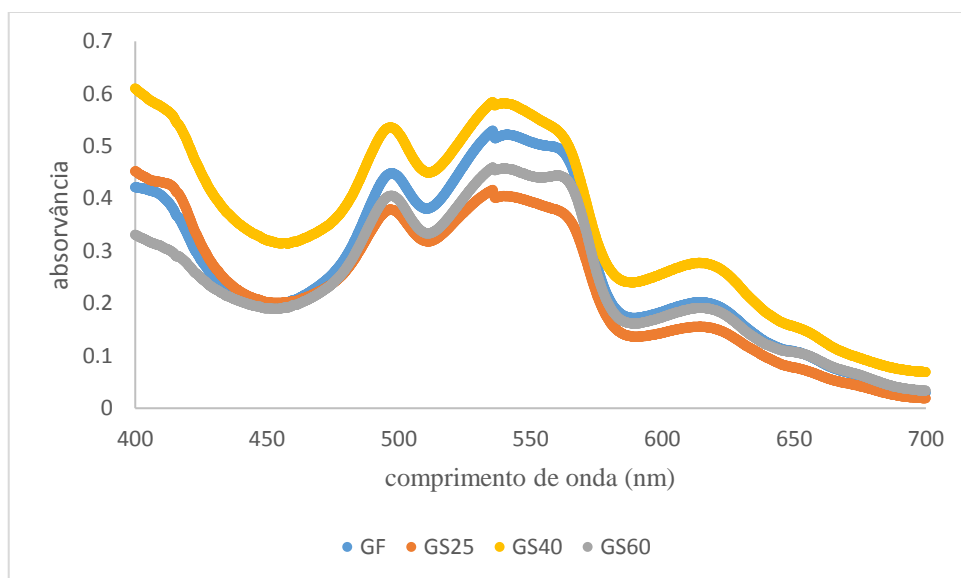


Figura 22. Perfil de absorvância dos extratos aquosos de ficolibiproteínas da *Gracilaria sp* fresca (GF), seca a 25°C (GS), seca a 40°C (GS40) e seca a 60°C (GS60). Os valores de absorvância representados resultam da média de triplicados.